

# **Die funktionelle Bedeutung hochkonservierter Aminosäurereste in der Prodomäne von Cathepsin S**

## **Dissertation**

**Zur Erlangung des doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Marc Fehn**

**geboren am 07.07.1971 in Kronach**

	SEITE:
Zusammenfassung .....	2
1. Einleitung .....	3
2. Material und Methoden .....	6
2.1. Materialien .....	6
2.1.1. Bakterienstämme .....	6
2.1.2. Enzyme, Substrate, Kits.....	6
2.1.3. Plasmide.....	6
2.1.4. Lösungen und Puffer.....	7
2.1.5. Bakterienmedien .....	7
2.1.6. Oligonucleotide.....	7
2.1.7. Geräte.....	8
2.2. Methoden.....	8
2.2.1. Mutagenese .....	8
2.2.1.1. Blunt-End Verfahren .....	8
2.2.1.2. Sticky-End Verfahren.....	9
2.2.2. Verdau des Wildtyp templates .....	10
2.2.3. DNA-Reinigung.....	10
2.2.4. Ligation.....	11
2.2.5. Transformation .....	11
2.2.6. Plasmidamplifizierung.....	11
2.2.7. Restriktionsfragmentanalyse.....	11
2.2.8. Sequenzierung.....	11
2.2.9. Umklonieren in Expressionsstamm .....	12
2.2.10. Induktion, Zellernte, Zellaufschluss .....	12
2.2.11. Saccharosegradienten-Zentrifugation .....	13
2.2.12. Gelfiltration .....	13
2.2.13. SDS-PGE .....	13
2.2.14. Silberfärbung .....	14
2.2.15. Massenspektrometrie mit MALDI-TOF .....	14
2.2.16. Bestimmung der Inhibitionskonstanten .....	15
3. Ergebnisse .....	16
3.1. Mutation, Expression und Reinigung von Mutanten des Propeptids von humanem Cathepsin S .....	16
3.1.1. Ergebnis der Restriktionsfragmentanalyse .....	19
3.1.2. Expression und Charakterisierung der mutierten Propeptide .....	20
3.1.2.1. Ergebnis der SDS-PAGE und Silberfärbung.....	20
3.1.2.2. Ergebnis der MALDI- Untersuchung .....	21
3.2. Einfluss der Mutationen auf das Bindungsverhalten des Propeptids gegenüber humanem Cathepsin S .....	22
4. Diskussion .....	46
5. Literaturverzeichnis .....	51
6. Danksagung .....	56

## Zusammenfassung

Viele Proteasen werden als Vorläufermoleküle synthetisiert. Sie besitzen Verlängerungen, Proregionen, die die katalytische Aktivität des Enzyms blockieren. In vielen Fällen hemmt auch ein freies Peptid mit der Aminosäuresequenz der Proregion, das Propeptid, die zugehörige Protease. Das gilt auch für die Cathepsin L-ähnlichen Endopeptidasen, eine Unterfamilie der Papainfamilie. Bei diesen auch medizinisch bedeutsamen Cysteinproteasen wurde eine spezifische und hochaffine Hemmung einiger Vertreter durch die jeweiligen Propeptide festgestellt. Die Suche nach dem Mechanismus dieser Hemmung und nach den für die Hemmung verantwortlichen Strukturmotiven innerhalb der Propeptide hat damit durchaus einen potentiellen therapeutischen Hintergrund. Diesbezügliche Untersuchungen basierten anfangs auf Sequenzvergleichen und führten zur Aufdeckung konservierter Motive, von denen insbesondere die umfangreiche ERW/FNV/IN-Sequenz als ein möglicher Kandidat für ein solches inhibitorisches Motiv diskutiert wurde. Untersuchungen mit Serien von Propetidmutanten, die im Vergleich zum Wildtyp von beiden Enden her immer stärker verkürzt wurden, und letztlich auch die Strukturaufklärung einer Reihe von Zymogenen aus der genannten Unterfamilie stellten diese Vermutung dann allerdings wieder in Frage, denn nur das weitgehend intakte Propeptid behält die Fähigkeit zur hochaffinen Interaktion mit seinem Zielprotein. Damit war die Frage nach der funktionellen Bedeutung der sich entlang der gesamten  $\alpha_2$ -Helix der Proregion erstreckenden ERW/FNV/IN-Sequenz weiterhin offen. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb versucht, durch systematische Mutationen im interessanten Bereich des beispielhaft gewählten Procathepsin S eine Antwort auf diese Frage zu finden. Insbesondere die Analyse des Hemmverhaltens einer Serie von Alanin-Punktmutanten, die neben den ERW/FNV/IN Aminosäuren auch potentielle strukturelle Interakteure umfasst, zeigte große Unterschiede in der Bedeutung der konservierten Aminosäuren für die Aufrechterhaltung der wichtigsten Funktion des Propeptids, die Hemmung der proteolytischen Aktivität des Enzyms. Die Interpretation aller Daten und die Planung der Mutationsexperimente erfolgte unter Verwendung eines berechneten Strukturmodells des Procathepsin S, das auf den Röntgenstrukturdaten des Prototypen der untersuchten Unterfamilie, Procathepsin L, basiert. Es zeigte sich, daß für die inhibitorische Funktion des Propeptids vor allem die drei konservierten Tryptophane W28, W31 und W52 entscheidend sind, die miteinander verschränkt, am Kreuzungspunkt der  $\alpha_1$ -Helix mit der  $\alpha_2$ -Helix im hydrophoben Kernbereich der Prodomäne liegen. Sie beeinflussen die untersuchte Funktion nachhaltiger als die zahlreichen Salzbrücken, von denen bislang angenommen wurde, daß sie den entscheidenden Beitrag zur Stabilisierung der Struktur

leisten. Das konnte durch die Herstellung und Charakterisierung von weiteren Alanin-Austauschmutanten bekräftigt werden, die an Ionenbindungen beteiligte Aminosäuren außerhalb des ERW/FNV/IN-Motivs betreffen. Das ERW/FNV/IN-Motiv der Cathepsin L – ähnlichen Endopeptidasen stellt folglich keine Funktionseinheit dar. Die einzelnen konservierten Aminosäuren sind offensichtlich in unterschiedlicher Weise an der Aufrechterhaltung von Struktur und Funktion der Proregion beteiligt, bezüglich der inhibitorischen Funktion bei schwach saurem pH kommt dem Stapel aus den drei genannten aromatischen Resten die mit Abstand größte Bedeutung zu.

## 1. Einleitung

Cathepsin S ist eine lysosomale Protease. Sie gehört, da sie in ihrem aktiven Zentrum einen Cystein-Rest besitzt, zur Superfamilie der Cysteinproteasen und innerhalb derer zur Papainfamilie, die in eine Cathepsin B-ähnliche und eine Cathepsin L-ähnliche Unterfamilie (z.B. Cathepsin L, S, K) aufgeteilt wird (Kirschke et al. 1998). Als Proteasen katalysieren die Cathepsine den Um- bzw. Abbau von Proteinen. Dies geschieht sowohl in der Zelle, in den sogenannten Lysosomen, als auch ausserhalb der Zellen, z.B. im Rahmen der Tumordinvasion. Physiologisch ist das Cathepsin L z.B. an der Antigenpräsentation in kortikalen Thymusepithelzellen beteiligt (Nakagawa et al. 1998). Das Cathepsin K ist im Rahmen des Knochenstoffwechsels bedeutsam. Es kommt in den Osteoklasten vor und beteiligt sich am Kollagenabbau. Das Cathepsin S wiederum, spielt eine wichtige Rolle bei der Antigenpräsentation am MHC II-Rezeptor-Komplex, wo es durch N-terminale Prozessierung der invarianten Kette (li-chain) wichtige Voraussetzungen zur Einlagerung des prozessierten Antigens in die Tasche des Rezeptors schafft (Villadangos et al. 1997, Riese et al. 1996; Shi et al. 1999).

Wie die meisten anderen Proteasen wird Cathepsin S als Zymogen, als inaktives Vorläufermolekül, Procathepsin S, synthetisiert. Ein solcher Mechanismus dient der zeitlichen und örtlichen Steuerung der Aktivität von Enzymen, deren katalytische Wirkung potentiell zur Zerstörung von Funktions- wie auch Strukturproteinen des Organismus führen könnte. Ein lange bekanntes und gut untersuchtes Beispiel für ortsabhängige Aktivierung sind die Verdauungsproteasen, z.B. Trypsin, Chymotrypsin, Carboxypeptidasen, die alle erst am Wirkort aus Zymogenen hervorgehen. In der Proform befindet sich kovalent am N-Terminus des Enzyms gebunden, eine ca. 100 AS lange Proregion, welche bei der Aktivierung des

Enzyms abgespalten wird (siehe Abb.10). Die Proregion ist jedoch nicht nur dann in der Lage das Enzym zu inhibieren, wenn sie kovalent mit diesem verbunden ist, sondern auch in freiem Zustand. Dann wird dieser Teil des Zymogens als Propeptid bezeichnet. Das konnte auch für einige andere Klassen von Proteasen und deren Propeptide gezeigt werden. Da Proteasen in eine große Zahl auch medizinisch bedeutsamer Prozesse eingreifen (z.B. Blutgerinnung, Entzündung, Apoptose, Tumormetastasierung), wurde bereits über eine pharmakologische Nutzung von inhibitorischen Propeptiden oder Teilsequenzen von Proregionen nachgedacht. In-Vitro hemmt beispielsweise das Propeptid von Cathepsin B im sogenannten Matrigel-Assay die Penetrationsfähigkeit von Lungenkarzinomzellen (Navab et al. 1997). Auch das Propeptid des Cathepsin S konnte im Matrigel-Assay die Penetration von Tumorzellen negativ beeinflussen (Kolkhorst et al. 1998). Zudem ist die Proregion als Teil des Addressierungssignals an der intrazellulären Sortierung von lysosomalen Proteinen beteiligt. Für Procathepsin L und Procathepsin D konnte eine Sequenz innerhalb des Propeptides gefunden werden, über die im sauren Milieu die Bindung an einen Rezeptor der Membranen von Mikrovesikeln erfolgt (McIntyre et al., 1994; Grassel und Hasilik, 1992).

Eine weitere mögliche Funktion von Propeptiden ist die eines intramolekularen Chaperons (Foldase), also einer Faltungshilfe für das Enzym. Diese Propeptidfunktion ist insbesondere für das bakterielle Subtilisin gut untersucht (Shinde und Inouye, 1995; Gallagher et al, 1995). Auch für das Cathepsin L ist die Anwesenheit der Proregion für die richtige Faltung sehr wahrscheinlich notwendig (Tao et al, 1994 ; Smith und Gottesman 1989).

Bezüglich der Grundfunktion, der Hemmung des Enzymes, zeigten Fox et al.(1992) innerhalb der Papainfamilie für das Propeptid des Cathepsin B, daß dieses das Cathepsin B signifikant stärker hemmte als Papain. In ähnlichen Arbeiten wurde eine vergleichbare selektive Inhibierung für andere Proteasen gefunden, so zum Beispiel für das Papain (Taylor et al,1995), oder auch für das Cathepsin L (Völkel et al. 1996, Carmona et al. 1996, Coulombe et al. 1996). Für das Propeptid vom Cathepsin S konnte eine Gruppenspezifität der Inhibierung für Cathepsin L ähnliche Proteasen gezeigt werden (Maubach et al. 1997).

Die Inhibierung des Enzyms erfolgt, indem der Zugang zum aktiven Zentrum blockiert wird. Der blockierende Teil der Proregion legt sich dabei zwischen die beiden katalytischen Domänen. Der N-terminal anschließende Abschnitt des Propeptides verankert sich über die Propeptid-bindende Schleife am Enzym. Vermutlich wird auf diese Weise der blockierende Anteil des Propeptides im aktiven Zentrum ausgerichtet. Bedeutsam ist, daß dies im Vergleich zum Substrat, in umgekehrter Orientierung erfolgt, so daß keine proteolytische Spaltung

erfolgen kann (Coulombe et al., 1996). Um die molekularen Grundlagen der inhibitorischen Funktion des Propeptides besser zu verstehen und gegebenenfalls kleinere inhibitorische Einheiten und Motive zu finden, wurden verschiedene Versuche unternommen. Chagas et al. (1996) arbeiteten mit 15 Aminosäuren grossen, synthetischen, überlappenden Peptiden des Propeptides vom Cathepsin B. Sie fanden, daß für optimale Inhibition das gesamte Propeptid notwendig ist, und daß kleinere Einheiten allenfalls schwach inhibitorisch wirken. Carmona et al. (1996) haben das Propeptid des Cathepsin L von beiden Enden her systematisch verkürzt. Auch sie kommen zum Ergebnis, daß volle Inhibition der kompletten Struktur bedarf. Verkürzung des C-terminalen Anteils der Proregion erwies sich allerdings als weniger folgenreich als die N-terminale Verkürzung.

In einem Homologievergleich verschiedener Proteasen der Papainfamilie aus unterschiedlichen Spezies zeigten Karrer et al. (1993), daß sich in den Proregionen aller Cathepsin L-ähnlichen Proteasen ein Sequenzmotiv aus neunzehn AS befindet. Dieses besteht aus sechs hochkonservierten AS, mit jeweils hochkonservierten Abständen. Die Konsensus-Sequenz lautet nach dem Einbuchstaben-Code ERW/FNV/IN. Das ERW/FNV/IN -Motiv befindet sich im Propeptid jedoch nicht an der Position, die das aktive Zentrum blockiert, so dass die Vermutung von Karrer et al., mit diesem Motiv die für die unmittelbare Blockierung der Enzymaktivität entscheidende Struktur gefunden zu haben, offensichtlich nicht zutrifft. Da aber eine N-terminale Verkürzung des Propeptides von Cathepsin L, die das ERW/FNV/IN -Motiv einschließt, die inhibitorische Wirkung entscheidend vermindert (Carmona et al. 1996), ist klar, daß diesem Teil des Moleküls eine entscheidende mittelbare Bedeutung für die Hemmfunktion der Proregion besitzt. Offen bleibt dabei die Frage, welche Bedeutung das hochkonservierte ERW/FNV/IN -Motiv in diesem, für die Hemmung so offensichtlich wichtigen Anteil der Proregion hat. Ist das Motiv selbst, insgesamt, als eine Funktionseinheit, oder einzelne Bestandteile daraus für das Hemmverhalten verantwortlich? Spielt das Motiv, oder Teile daraus, eine Rolle bei der räumlichen Verankerung der Helices und des gesamten Moleküls und damit bei der Interaktion mit dem Enzym? Diesen Fragen wird in der vorliegenden Arbeit mit einem in diesem Zusammenhang neuen methodischen Ansatz nachgegangen.

Dazu wird der von Maubach et al. 1997 zur Herstellung von rekombinantem Propeptid konstruierte Vektor durch eine Reihe ortsgerichteter Mutagenesen verändert. Die konservierten Aminosäuren wurden entweder in Gruppen oder einzeln gegen Alanin

ausgetauscht. Alanin wurde ausgewählt, da sie eine kleine ungeladene Aminosäure ist, die die Struktureffekte der vorher integrierten Aminosäuren demaskiert. Aus der Stärke der Wechselwirkung der mutierten Propeptide mit nativem humanen Cathepsin S, quantifiziert durch den Ki-Wert der Hemmung des Umsatzes eines geeigneten fluorogenen Substrates, ist dann die Bedeutung der 6 ERW/FNV/IN -Aminosäuren für die Funktion des Propeptides ableitbar.

## **2.Materialien und Methoden**

### **2.1 Materialien**

#### **2.1.1 Bakterienstämme**

E.coli XL-1Blue MRF (Stratagene)

E.coli BL21(DE3) (Novagene)

E.coli TOP10F' (Invitrogen)

#### **2.1.2 Enzyme, Substrate, Kits**

humanes Cathepsin S (nach Vorschrift von G. Maubach et al.: Europ. J. Biochem. 250/ 745-750)

DNA-Polymerase (Stratagene)

T4-DNA-Ligase (Gibco BRL)

Restriktionsendonucleasen:

DpnI; HindIII (Boehringer Mannheim)

XbaI (Gibco BRL)

Sequi Therm EXCEL(II)Long-Read DNA-Sequencing-Kit-LC (Epicenter Technologies)

QuiaEx II Gel Extraktion-Kit (150) (Quiagen)

Quiaprep 8 Plus Plasmid-Kit (10) (Quiagen)

Z-Val-Val-Arg-NH-Mec (Bachem Biochemical GmbH)

#### **2.1.3 Plasmide**

pASK-hppCS ...(G. Maubach et al.: Europ. J. Biochem. 250/ 745-750)

### 2.1.4 Lösungen und Puffer

Puffer W: 100mM Tris/HCl pH 8,0, 1mM EDTA, 0,02%(w/v) Natriumazid

Puffer X: 100mM Tris/HCl pH 8,0, 1mM EDTA, 1% Triton

Puffer S: 250mM Saccharose, 100mM Tris/HCl pH 8,0, 1mM EDTA

Puffer V: 1mM Tris/HCl pH 8,0, 1mM EDTA

Puffer D: 50mM Natriumazetatpuffer pH 4,5, 0,6 M GdnHCl

Puffer D1: 50 mM Natriumacetatpuffer pH 4,5, 0,5 M GdnHCl, 15% Azetonitril

Probenpuffer für SDS-PAGE(5x): 2,5 ml SDS (20%ig), 1 ml Glycerol, 1,5 ml 1 M Tris/HCl pH 6,8

0.55 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol, Bromphenolblau

Sinapinsäurelösung: 2 mg Sinapinsäure, 150  $\mu$ l 33%(v/v) Azetonitril, 0,1% (w/v)

Trifluoressigsäure (TFA) in Wasser

10x Polymerase Reaktions-Puffer (Stratagene)

dNTP-Mix (Boehringer Mannheim)

MgCl<sub>2</sub> (Gibco BRL)

Puffer A (Boehringer Mannheim)

Ligase-Puffer (Gibco BRL)

Puffer T:	50mM K-Phosphat pH 6,5
	50mM NaCl
	2mM EDTA
	2mM DTT

### 2.1.5 Bakterienmedien

LB-Medium: 5g/l Hefeextrakt, 10g/l Casitone, 10g/l Natriumchlorid pH 7.0

LB-Ampicillin-Platten: 5g/l Hefeextrakt, 10g/l Casitone, 10g/l Natriumchlorid, 15g/l Bacto-Agar,  
50 $\mu$ g/ml Ampicillin pH 7.0

### 2.1.6 Oligonucleotide

Es wurden verschiedene Sense- und Antisenseprimer zur Herstellung der rekombinanten DNA verwendet.

Die Mutationsprimer sind im Ergebnisteil in Form einer Tabelle aufgelistet.

Außerdem kam noch ein Sequenzierprimer, als Starter der Sequenzierreaktion zum Einsatz.



Sequenzierprimer IR4: 5'-TGT GCT TCC AGG GCC CCC-3'

### **2.1.7. Geräte**

Thermocontroller PTC-100 (MJ Research, Inc.)

Thermocycler Progene (Techne)

Tischzentrifuge MC 12V (Sorvall)

Megafuge 1.0R (Heraeus)

Ultrazentrifuge L70 (Beckman)

Ultrazentrifuge RC5B (Sorvall)

LI-COR 4000L Sequenzer (MWG-Biotech)

UV 1202 Photometer (Shimadzu)

Ultraschall-Desintegrator, Bandelin sonoplus HD70 (Bandelin electronic)

Gelchromatographiesäule, HiLoad Superdex-75 16/60 (Pharmacia Biotech)

Protein-Elektrophoresesystem, Mini-PROTEAN II (Bio-Rad)

Fluorimeter, Fluoroscanner II-reader (Labsystems)

LS 50 B luminescence spectrometer (Perkin Elmer)

Laser Tech Research H-Massenspektrometer (PerSeptive Biosystems)

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Mutagenese**

Es kamen zwei verschiedene PCR-Verfahren für die Mutagenese zum Einsatz.

#### **2.2.1.1 Blunt-End-Verfahren**

Der die Mutation enthaltende sense-Primer und der 5'-phosphorylierte antisense-Primer wurden so konstruiert, daß, am Insert angelagert, ihre Startpunkte genau aneinanderstoßen, also nicht überlappen. Im Laufe der PCR wird das Plasmid nun vervielfältigt. Es entstehen so exponentiell, lineare Produkte mit glatten Enden.

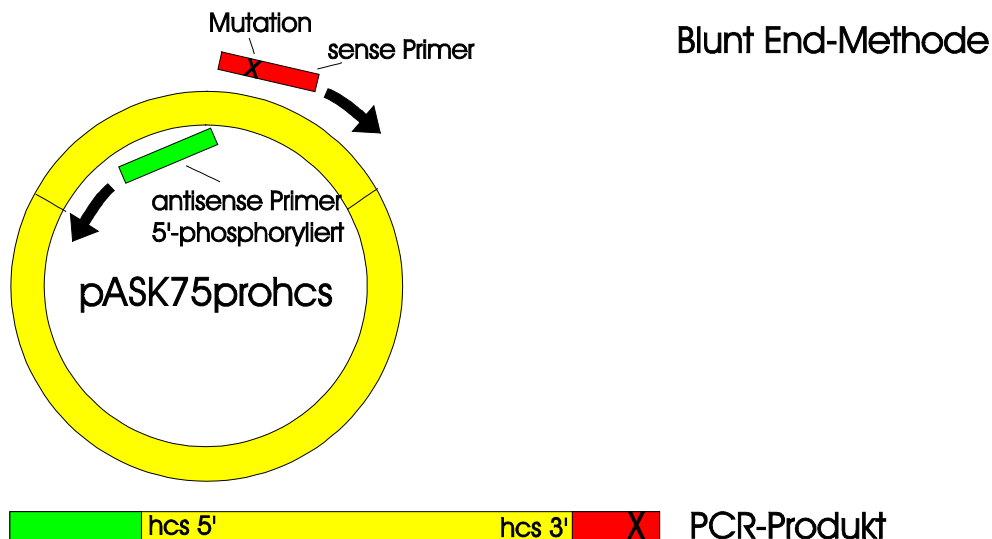


Abb.1: Schema der Mutagenese und des entstehenden Produktes. Die Bedingungen sind im untenstehenden Kasten aufgeführt.

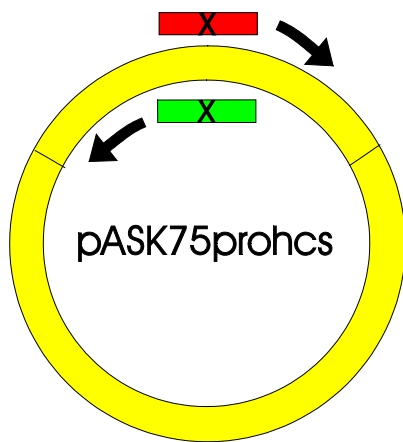
Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denat.	95°C	3 min	1
Denat.	94°C	30 s	4
Annealing	61-1°C/Zykl.	30 s	4
Synthese	72°C	4 min	4
Denat.	94°C	20 s	20
Annealing	58-0,2°C/Zykl	20 s	20
Synthese	72°C	3 min	20
Synthese	72°C	10 min	1

### 2.2.1.2 Sticky-End-Verfahren

Die mutationstragenden Primer wurden so konstruiert, daß sie sich überlappend am Insert anlagern. Phosphorylierungsstellen an den Primern sind hierbei nicht nötig. Nach der PCR-Reaktion und Verdau der Template- DNA mit DpnI legen sich die so entstandenen Einzelstränge aneinander und bilden Doppelstränge mit überstehenden, komplementären Enden. Über diese Enden ligiert das Produkt, welches nunmehr als zirkulärer Doppelstrang vorliegt.

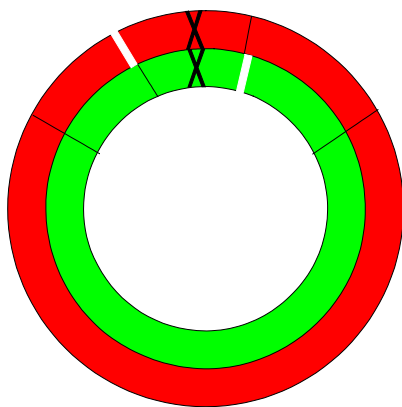
Vorteil dieser Methode ist, daß keine Ligation nötig ist, da die entstehenden 'Nicks' (Einzelstrangbrüche) vom bakterieneigenen Reparatursystem repariert werden. Es findet bei

dieser Methode keine exponentielle Vermehrung statt, da aufgrund der Wahl der Primerstartpunkte immer nur die Ausgangsmatrize abgelesen werden kann.



Sticky End-Methode

Abb.2: Schema der Sticky-End Methode. Die Primer lagern sich überlappend an. Die PCR-Bedingungen sind identisch mit denen der Blunt-End Methode.



PCR-Produkt nach Verdauung  
der unmutierten Stränge

Abb.3: Die überstehenden Enden der Produkte lagern sich nach Verdauung der unmutierten Stränge spontan aneinander an. Die entstandenen Einzelstrangbrüche werden vom bakterieneigenen Reparatursystem repariert. Es liegen dann wieder zirkuläre Plasmide vor.

### 2.2.2 Verdauung des Wildtyp-templates

Mit DpnI wird selektiv die Wildtyp-DNA zerschnitten (2h; 37°C), da diese DNA, aus Bakterien stammend, im Gegensatz zum PCR-Produkt, methyliert ist, und DpnI nur methylierte DNA schneidet.

### 2.2.3 DNA-Reinigung

Mit dem QuiaexII-Kit (siehe Quiagen- Protokoll) werden Salze, Enzyme und verbliebene dNTPs aus dem Ansatz entfernt, da diese die empfindliche Ligase stören könnten.

### 2.2.4 Ligation

Die linearen, gereinigten Produkte der Blunt-End-Methode werden mit Ligase (12h;RT) inkubiert. Über den phosphorylierten Rest am 5'-Ende, und der OH-Gruppe am 3'-Ende wird die Ringstruktur hergestellt. Der verbleibende Strangbruch wird vom Bakterium geschlossen. Somit liegt wieder ein ringförmiges Plasmid vor.

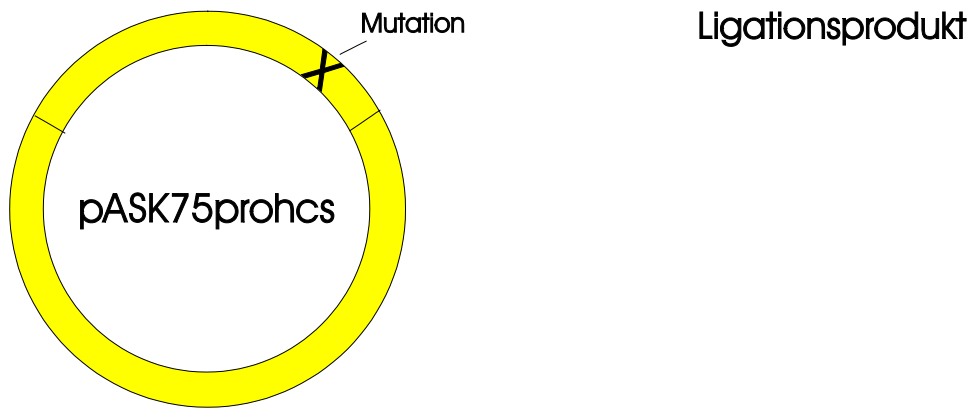


Abb.4: Das Blunt-End Produkt nach enzymatischer Ligation.

### 2.2.5 Transformation

Die Plasmide werden in E.coli XL1-Blue Competent Cells (Rapid Transformation Protocol) transformiert, auf LB-Agarplatten (50µg/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bebrütet (37°C).

### 2.2.6 Plasmidamplifizierung

Es werden 5 weisse Klone gepickt und damit 5ml LB-Medium(50µg/ml Ampicillin) angeimpft, 8h geschüttelt (37°C) und anschließend mit dem Quiawell 8 Plus-Kit (Quiagen) die Plasmid-DNA isoliert.

### 2.2.7 Restriktionsfragmentanalyse

Mit HindIII und XbaI wird das Insert ausgeschnitten und auf einem 1.5% Agarosegel mittels Elektrophorese kontrolliert, ob die 3.2kb - und 300bp-Fragmente entstanden sind.

### 2.2.8 Sequenzierung

Die DNA der Klone mit positiven Fragmentmuster wurde nun durch Darstellung der Basenabfolge auf Vorhandensein der Mutation und auf Intaktheit des übrigen Propeptides untersucht. Hierzu wurde das „cycle-sequencing“-Verfahren verwendet, eine Kombination aus Didesoxynukleotid-Abbruchmethode und einer PCR.

Der Ablauf erfolgte nach untenstehendem Cycle-Sequencing-Protocol.

Bedingungen der Sequenzier-PCR-Reaktion:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Hot start	94°C	2 min	1
Denat.	94°C	15 s	25
Annealing	60°C	15 s	25
Synthese	72°C	30 s	25
Denat.	94°C	15 s	6
Synthese	72°C	30 s	6

Die Sequenzierung wurde mit dem LI-cor 4000L Sequenzer durchgeführt, nach dem Standardprotokoll für 41cm Gele. Zur Auswertung der elektrophoretisch getrennten Sequenzierreaktion wurde die Software Base ImagIR verwendet. Zum Vergleich der Sequenzdateien mit der Originalsequenz wurde das Programm Lasergene (DNASTAR INC.) genutzt.

### **2.2.9 Umklonieren in Expressionsstamm**

Die Klon mit Mutation und korrekter Sequenz werden in E.coli BL21 (DE3) umkloniert (Rapid Transformation Protocol).

### **2.2.10 Induktion, Zellernte, Zellaufschluss**

Um das Propeptid zu exprimieren, wurden 200ml LB-Medium mit einem Einzelklon angeimpft und bei 37°C geschüttelt, bis eine OD von ca. 0.5, gemessen bei 550nm, erreicht wurde. Anschließend wurden 40 µg Anhydrotetracyclin/l Kulturvolumen hinzupipettiert. Da der pASK-Vektor einen Tetrazyklinpromotor enthält, wird auf diesem Wege die Proteinsynthese 'induziert'. Es wurden weitere 3h bei 37°C geschüttelt. Die Zellernte erfolgte nach 12 min Zentrifugation der Kultur bei 6000 g. Mit Puffer W wurde das Pellet resuspendiert und die Bakterienzellen anschließend durch Ultraschall (5x 30s) aufgeschlossen. Ein weiterer Zentrifugationsschritt (10min; 6000g) trennt das lösliche Protein von unlöslichen Bestandteilen. Das Pellet wird im detergentenhaltigen Puffer X gewaschen und nach nochmaliger Zentrifugation (10 min, 6000g) im Puffer S aufgenommen.

### 2.2.11 Saccharosegradienten-Zentrifugation

Das Propeptid wird in Form sogenannter „inclusion-bodies“, Gebilde festgepackten Proteins ohne umgebende Hülle, exprimiert. Durch Ultrazentrifugation in einem kontinuierlichen Saccharosegradienten von 40%- 70% (w/w) werden die inclusion-bodies von den übrigen Zellbestandteilen abgetrennt. Die Röhrchen wurden mit 30 ml der Gradientenlösung gefüllt, auf 4°C vorgekühlt und dann mit 2 ml Probe überschichtet. Bei 4°C wurde 2h lang mit 28000g (141000g am Röhrchenboden) zentrifugiert. Anschließend wurde der Röhrchenboden angestochen und der Inhalt in 2 ml Fraktionen gesammelt. Durch Bestimmung der OD bei 600 nm wurden die Fraktionen mit den inclusion-bodies identifiziert. Es hat sich gezeigt, daß sich die 'Inclusion-bodies' in der untersten, der drei entstehenden Banden befinden, so daß nur noch diese Fraktionen aufgefangen wurden (siehe Abb.6). Diese Fraktionen wurden vereinigt, die Saccharosekonzentration durch Zugabe von Puffer V verdünnt und 30min lang bei 4°C und 20000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde über Nacht im chaotropen Puffer D gelöst. Anschließend erfolgte noch ein Ultraschallbad für 15 min bei max. Intensität, um die Auflösung des Pellets zu beschleunigen.

### 2.2.12 Gelfiltration

Zur Endreinigung des Propeptides erfolgte eine Gelfiltration, bei der eine Hiload Superdex-75 16/60 Säule (Pharmacia Biotec) eingesetzt wurde. Vor Beladung der Säule wurden die Proben zur Entfernung eventueller Präzipitate nochmals zentrifugiert. Die Bedingungen für die Trennung waren wie folgt gewählt:

Auftragung: 1-2 ml (Probe im Puffer D)

Flußrate: 1 ml/min (Puffer D1)

Fraktionsvolumen: 1 ml

Im Eluat wurde die Proteinkonzentration mit einem UV-Detektor bei 280 nm gemessen und registriert.

Im ersten großen Gipfel befindet sich das Propeptid (G. Maubach, 1996). Diese Fraktionen wurden vereinigt, über eine YM 10 Membran ultrafiltriert, konzentriert und anschließend bei -80°C gelagert. Mit Hilfe des aus der Aminosäuresequenz kalkulierten molaren Extinktionskoeffizienten wurde die Proteinkonzentration errechnet.

### 2.2.13 SDS-PAGE

Die Polyacrylamidgelelektrophoresen wurden nach Lämmli (1970) unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Die Proben wurden mit Ethanol gefällt, das Sediment mit Probenpuffer versetzt und bei 95°C 5min inkubiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 200 V Spannung. Die Trennzeit betrug 45 min. Es wurden 20%-ige Trenngele verwendet.

#### **2.2.14 Silberfärbung**

Zur Analyse des Reihungsgrades des Propeptides wurden Silberfärbungen der Elektrophoresegele angefertigt. Diese wurden nach einer modifizierten Version der „rapid silver staining“ Methode von Blum et al. (1987), (G. Maubach, persönliche Mitteilung) durchgeführt.

Fixierung mit Essigsäure (12%), Methanol (50%)	30 min
Waschen mit Ethanol (50%)	3x 15 min
Sensibilisierung mit Natriumthiosulfat (0,129 g/l)	1 min
Waschen mit Wasser (tridestilliert)	3x 20 sek.
Imprägnieren mit Silbernitrat (2 g/l) und Formaldehyd (0,75 ml/l)	8 min
Waschen mit Wasser (tridestilliert)	2x 20 sek.
Entwickeln mit Natriumkarbonat (60g/l), Formaldehyd (0,5ml/l), Natriumthiosulfat (4,3 mg/l)	
Stoppen mit Essigsäure (1N)	2 min
Waschen mit Ethanol (50%)	10 min

#### **2.2.15 Massenspektrometrie mit MALDI-TOF**

Das Molekulargewicht der gereinigten Propeptidmutanten wurde mit Hilfe der Massenspektrometrie bestimmt. Falls störende Salzkonzentrationen nicht durch Verdünnen der Stammlösungen auf ca. 10µM zu reduzieren waren, wurden die Proben gegen eine 20 mM Phosphatlösung pH 4,0 mit 11 % (v/v) Acetonitril dialysiert. Dieses Material wurde dann im Verhältnis 1:1 und 1:3 mit Sinapinsäurelösung vermischt und anschliessend sofort 2 µl auf jeweils eine Probenträgerposition pipettiert und eingetrocknet. Dies entsprach der empfohlenen Proteinmenge von 5-10 pmol/Position. Die Messungen am Massenspektrometer erfolgten im Linearbetrieb unter Verwendung von Cytochrom C als Molekulargewichtsstandard

#### **2.2.16 Bestimmung der Inhibitionskonstanten**

Die Enzymaktivität, somit indirekt die Hemmkapazität der einzelnen mutierten Propeptide, wurde durch fluorometrische Messung bestimmt. Cathepsin S spaltet vom Substrat Z-Val-Val-Arg- NH-Mec die fluorogene Gruppe NH-Mec ab, die nun stärker fluoresziert. Diese Änderung im Fluoreszenzverhalten des Tests wurde als Funktion der Zeit registriert und ausgewertet. Die Wellenlängen für die Exzitation und Emmission lagen bei 360 bzw. 460 nm, die Wahl berücksichtigt die Unterschiede im Fluoreszenzverhalten von Substrat und Produkt. Die Reaktionen wurden bei 37°C in einer gerührten 2 ml Küvette unter Verwendung von Puffer T durchgeführt. Die Enzymkonzentration lag bei etwa 0.25nM, die Substratkonzentration [S] grundsätzlich bei 40µM. Die InhibitorKonzentration [I] wurde für die einzelnen Messungen je nach inhibitorischem Effekt gewählt. Nachdem der Reaktionsansatz die vorgeschriebene Temperatur erreicht hatte, wurde die Reaktion durch Zugabe des Enzyms gestartet.

Für die Berechnung der Dissoziationskonstanten des Enzym-Propeptid-Komplexes ( $K_i$ ) für kompetitive Inhibition gemäß Schema 1 wurde entweder die Anfangsgeschwindigkeit ( $v_z$ ) der „steady-state“ Geschwindigkeit ( $v_s$ ) der Produktbildung für jeden Test nach Gleichung 1 ermittelt und die erhaltenen Werte für jede Testreihe gemäß Gleichung 2 zur Berechnung von  $K_i$  genutzt.

$$P = v_s \cdot t + (v_0 - v_s) \cdot \frac{1 - e - k_{obs}t}{k_{obs}} \quad \text{Gleichung 1}$$

In Gleichung 1 stehen P und t für die experimentell ermittelten Produktkonzentrationen bzw. die Reaktionszeit,  $v_z$ ,  $v_s$  und  $k_{obs}$  sind die zu optimierenden Parameter (Morrison und Walsh, 1988). In Gleichung 2 steht v für  $v_z$ , oder  $v_s$ ,  $V_{max}$  errechnet sich aus der Geschwindigkeit der ungehemmten Reaktion unter Berücksichtigung des  $K_m$ -Wertes für das verwendete Substrat von  $13,8 \pm 1,8 \mu\text{M}$  (Maubach et al., 1997).

$$\frac{v_s}{V_{max}} = \frac{[S]}{(1 + [I]/K_i) * K_m + [S]} \quad \text{Gleichung 2}$$

Der Substratverbrauch während der Messung war vernachlässigbar gering. Alle Berechnungen erfolgten mit Hilfe des kommerziellen Optimierungsprogramms „GraphPad Prism“.

### 3. Ergebnisse



Infolge der in der Einleitung aufgeführten Fakten und Überlegungen war zu erwarten, dass zumindest einige der zum ERW/FNV/IN - Motiv gehörenden Aminosäurereste von essentieller Bedeutung für die inhibitorische Funktion der Proregion von Procathepsin L sein könnten. Da die bisherigen diesbezüglichen Struktur-Funktions-Untersuchungen aber das vergleichsweise grobe Verfahren der massiven Verkürzung der Primärstruktur genutzt hatten, war ein Effekt, der nur an die Kettenlänge und nicht an spezifische Reste gebunden ist, nicht auszuschliessen. Deshalb begann die vorliegende Untersuchung mit der Klärung der Frage, ob eine Substitution aller konservierten ERW/FNV/IN - Reste in der Proregion von humanem Procathepsin S durch Alanin bei unveränderter Kettenlänge überhaupt zu messbaren funktionellen Konsequenzen führt. Cathepsin S erscheint für eine solche Untersuchung deshalb besonders geeignet, da sein Propeptid innerhalb der relevanten Unterfamilie der Cathepsin L-ähnlichen Endopeptidasen bei hoher Affinität keine absolute, sondern vermutlich eine Gruppenspezifität (Maubach et al. 1997) aufweist. Die Vorversuche bewiesen die Richtigkeit des Konzeptes, in zwei weiteren Versuchsreihen mit zunehmend detaillierter Fragestellung wurde die Untersuchung fortgeführt, bzw. abgeschlossen. Jede Versuchsreihe umfasste die Expression und Reinigung einer Reihe von Mutanten des Propeptids von humanem Cathepsin S und die Untersuchung der Wechselwirkung mit dem reifen Enzym zur Bestimmung der  $K_i$ -Werte. Cathepsin S stand aus Beständen der Arbeitsgruppe zur Verfügung. Die Herstellung der rekombinanten Propeptidmutanten erfolgte mit geringfügigen Modifikationen jeweils nach dem gleichen Protokoll, das im folgenden Abschnitt 3.1 mit beispielhaften Zwischenergebnissen und allen Endergebnissen vorgestellt wird. Die Planung, Durchführung und Bewertung der Inhibitionsstudien mit diesen Mutanten wird im Abschnitt 3.2 beschrieben.

### **3.1 Mutation, Expression und Reinigung von Mutanten des Propeptids von humanem CathepsinS**

In Tabelle 2 sind alle im Verlauf der Untersuchungen unter Verwendung des von Maubach et al. konstruierten Plasmids pASK-hppCS und der in Tabelle 1 zusammengestellten Primer hergestellten Mutationen des Propeptids vom humanen Cathepsin S aufgelistet.

Tab. 1: Auflistung der Primersequenzen zur Herstellung der Mutanten

[illegible]

53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99
M	G	M	H	S	Y	D	L	G	M	N	H	L	G	D	M	T	S	E	E	V	M	S	L	M	S	S	L	R	V	P	S	Q	W	Q	R	N	I	T	Y	K	S	N	P	N	R	I
ATG	GGA	ATG	CAC	TCA	TAC	GAT	CTG	GGC	ATG	AAC	CAC	CTG	GGA	GAC	ATG	ACC	AGT	GAA	GAA	GTG	ATG	TCT	TTG	ATG	AGT	TCC	CTG	AGA	GTT	CC	AGC	CAG	TGG	CAG	AGA	AAT	ATC	ACA	TAT	AAG	TCA	AAC	CCT	AAT	CGG	ATA

C

CTG

GGA

GCC

ATG

ACC

AGT

GA

TC

ACT

GGT

CAT

GGC

TCC

CAG

G

GT

GAA

GCA

GTG

ATG

TCT

TTG

ATG

AGT

TCC

C

TGG

TCA

TGT

CTC

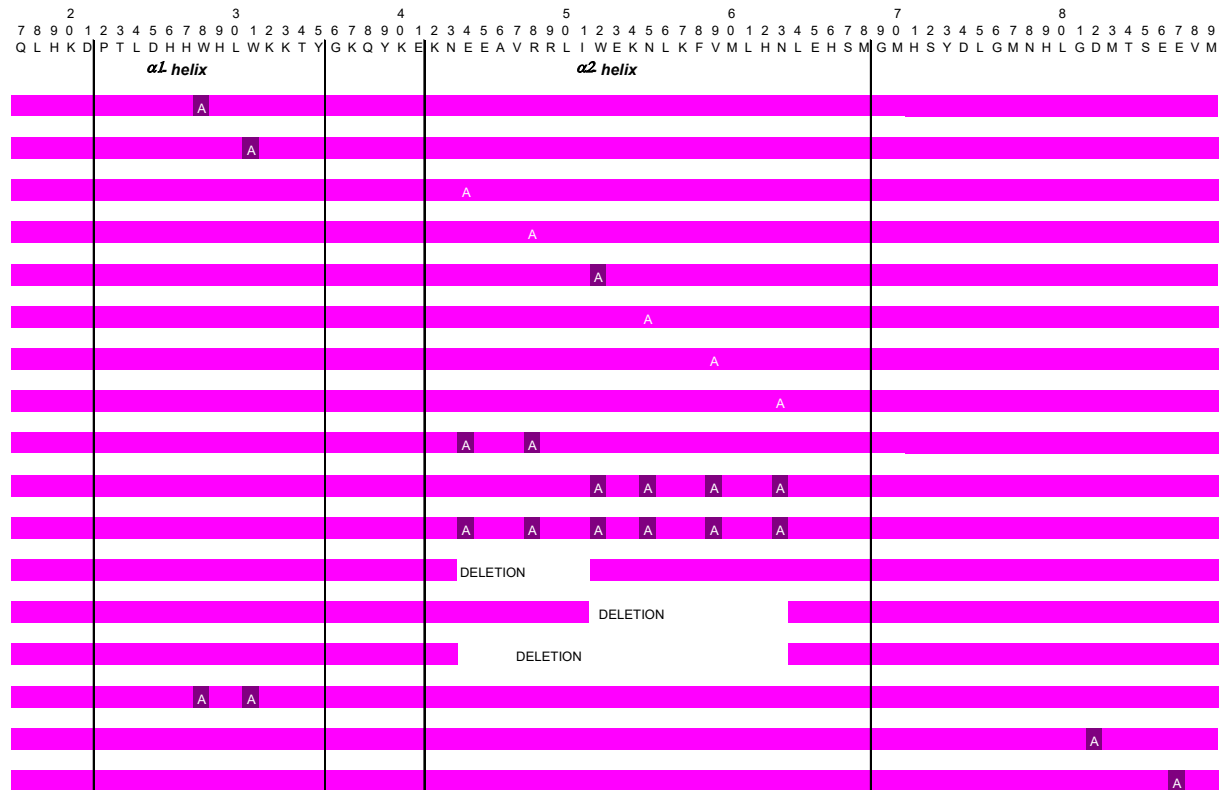
CCA

GGT

GGT

TC

Tab. 2 Lokalisation der Mutationen innerhalb des Propeptides von Cathepsin S



### 3.1.1 Ergebnis der Restriktionsfragmentanalyse

Die Mutationen erfolgten mittels PCR wie in der Methodik ausführlich beschrieben. Die PCR-Produkte wurden der Restriktionsfragmentanalyse unterworfen. Abb. 5 zeigt, dass nach dem Ausschneiden des Inserts aus dem Vektor zwei Fragmente pro Spur zu sehen sind. Die Bande zwischen dem 3 kbp- und dem 4 kbp-Standard stellt den Vektor mit einer Länge von 3,2 kbp dar. Die Auftrennung größerer Fragmente ist in einem 1.5%-igen Agarosegel schlecht, dafür werden kleinere Fragmente umso besser aufgetrennt. Die zweite Bande zwischen dem 298bp- und dem 344 bp- Standard entspricht dem Insert, verlängert um einige Basenpaare, die die multiplen Klonierungsstellen des Vektors bilden. Die DNA aller im Bild dargestellten Klone ist „fragmentpositiv“ und konnte somit sequenziert werden. Es handelt sich hierbei um die DNA von sechs Klonen der W52A Mutante.

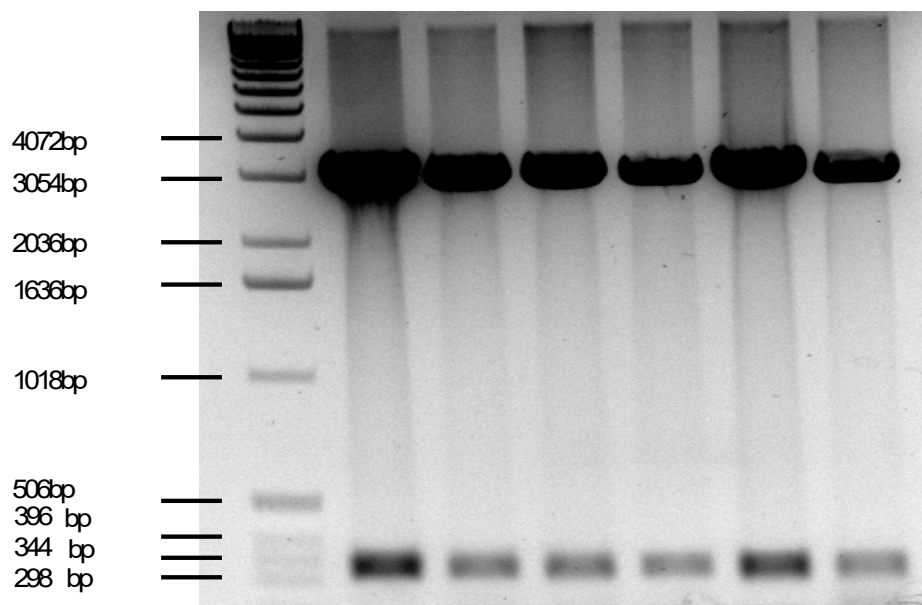


Abb.5: Fragmentmuster nach Ausschneiden des für das Propeptid Cathepsin S codierenden Inserts (300bp-Bande) aus dem pASK75-Vektor (3,2 kbp-Bande) und elektrophoretischer Auftrennung im 1,5%-igen Agarosegel. (siehe Methoden)

Die Überprüfung der Fragmente ist der erste wichtige Kontrollschritt nach den vorausgehenden Arbeitsschritten. Es wurden nur die positiven Klone mit den korrekten Fragmentmustern auf Korrektheit der Mutation und Intaktheit des übrigen Inserts überprüft. Dies geschieht anhand der Darstellung der Primärstruktur mittels Sequenzierung. Die Sequenzen der jeweiligen Mutanten sind im einzelnen nicht gesondert aufgeführt, jedoch anhand der Mutanten- und Primertabelle (siehe Tabellen 1 und 2) leicht zu erschließen.

### 3.1.2 Expression und Charakterisierung der mutierten Propeptide

Nach Expression des Propeptids in den BL21 Zellen in Form der inclusion-bodies, müssen diese zurückgewonnen und gereinigt werden.

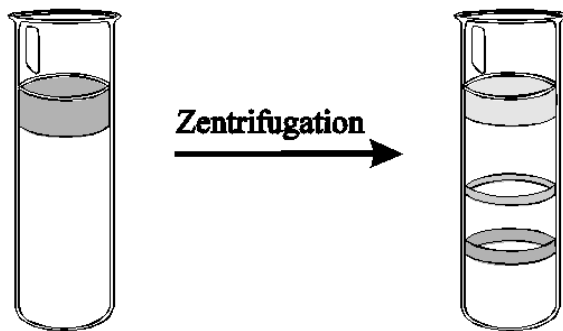


Abb.6: Bandenmuster nach Dichtegradientenzentrifugation. Das Propeptid befand sich in den inclusion-bodies in der obersten Bande. (siehe Methoden).

Die Propeptide wurden anschließend mittels Gelfiltration gereinigt.

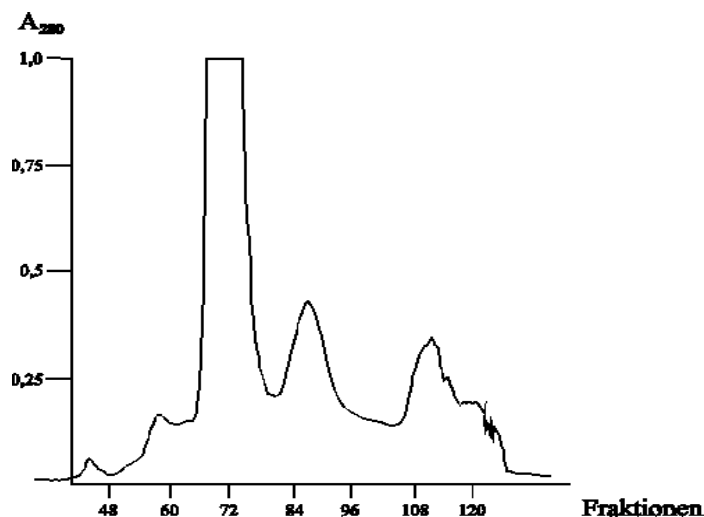


Abb.7: Elutionsprofil einer Trennung von Proteinfractionen mittels Gelfiltration nachdem vorher die Bakterien aufgeschlossen, und die Zellbestandteile abzentrifugiert worden waren. Die Fraktionen des ersten Gipfels enthielten das Propeptid. (siehe Methoden).

Vor dem Einsetzen in weitere Experimente wurden der Reinheitsgrad der Präparationen und das Molekulargewicht überprüft (siehe MALDI und SDS-PAGE).

### 3.1.2.1 Ergebnis der SDS-PAGE und Silberfärbung

Die Proteine wurden durch Kochen in Probenpuffer denaturiert und elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Banden bilden eine Front, das heißt, daß sich die Proteine hinsichtlich ihrer Größe nur unwesentlich unterscheiden. Dass keine Nebenbanden zu sehen

sind, bedeutet einen hohen Reinheitsgrad. Der mitgeführte Molekulargewichtsstandard und die Probe des Wildtyp-Propeptides (WT) lassen erkennen, dass die Molekulargewichte der Mutanten im erwarteten Bereich liegen.

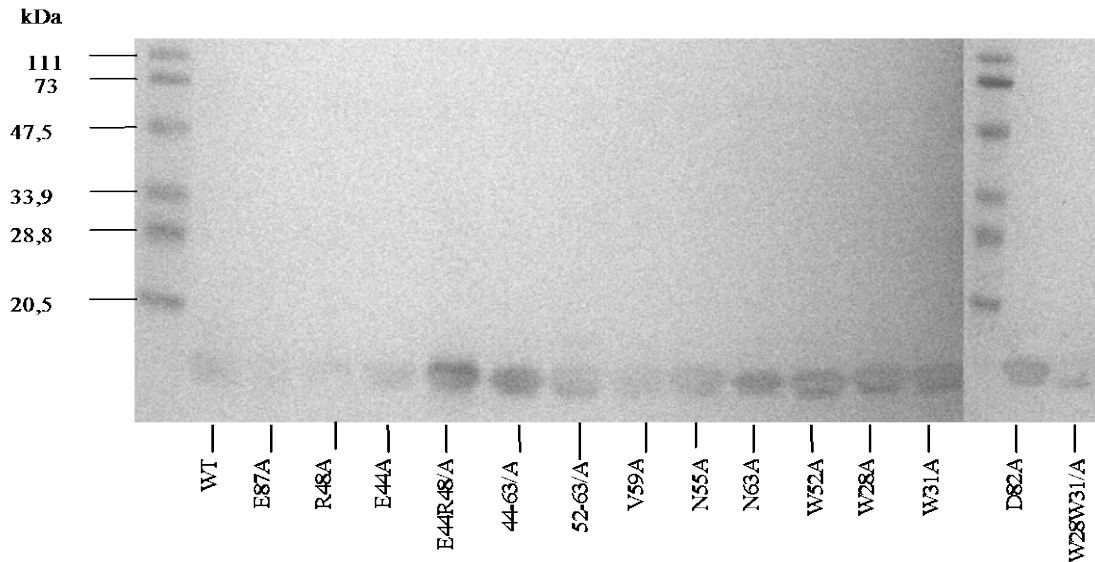


Abb.8: Silberfärbung nach SDS-PAGE. (siehe Methoden).

### 3.1.2.2 Ergebnis der MALDI- Untersuchung

Tab. 3: Molekulargewichtsbestimmung der Propeptidmutanten mittels

MALDI-TOF-Massenspektrometrie (Mittelwerte aus 3-5 Messungen)

Mutante	Molekulargewicht		
	Errechnet	Gemessen	Differenz
Wildtyp	11932	11939	7
E87A	11874	11875	1
R48A	11847	11879	32
E44A	11874	11881	7
44,48A	11789	11796	7
44,48,52,55,59,63A	11560	11550	-10
52,55,59,63A	11703	11699	-4
V59A	11904	11914	10
N55A	11889	11903	14
N63A	11889	11879	-10
W52A	11817	11839	22
W28A	11786	11789	3
W31A	11786	11784	-2
D82A	11858	11859	1

Tabelle 3 enthält die Ergebnisse der massenspektrometrischen Molekulargewichtsbestimmung. Im Vergleich mit den jeweils aus der Aminosäuresequenz errechneten Werten liegen die Abweichungen grundsätzlich bei weniger als 33, meist sogar unter 10 Dalton. Das ist deutlich weniger als das durchschnittliche Molekulargewicht einer Aminosäure und wurde als Beweis für die korrekte Expression der jeweils gewünschten Sequenz gewertet.

Darüber hinaus gestatten diese Messungen auch eine Abschätzung des Reinheitsgrades der rekombinanten Proteine. Das wird für die Mutante W28A beispielhaft in der Abb. 9 demonstriert. Der große zentrale Gipfel entspricht dem einfach protonierten Peptid (11782,8 Dalton). Der linke Gipfel (5889,6 Dalton) entspricht der doppelt protonierten Form, die die Messstrecke mit etwa doppelter Geschwindigkeit durchfliegt, während der rechte Gipfel (23629,2 Dalton) dem einfach protonierten Dimer entspricht. Nennenswerte Verunreinigungen im untersuchten Molekulargewichtsbereich sind nicht auszumachen.

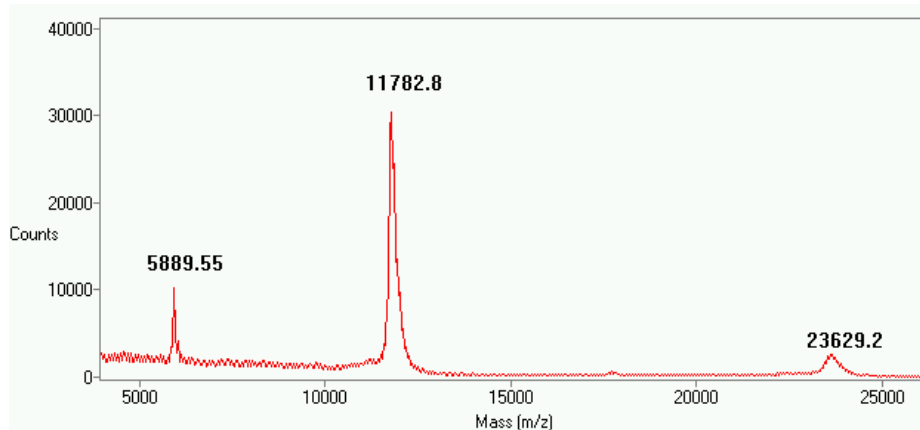


Abb.9: Ergebnis der massenspektrometrischen Untersuchung der Mutante W28A  
Die experimentellen Bedingungen sind in der Methodik ausführlich beschrieben.

### 3.2 Einfluß der Mutationen auf das Bindungsverhalten des Propeptids gegenüber humanem Cathepsin S

Um zu prüfen, ob das ERW/FNV/IN -Motiv überhaupt eine Bedeutung für die Blockierung des aktiven Zentrums von humanem Cathepsin S besitzt, begannen die Untersuchungen mit Messungen der Inhibition von Cathepsin S durch die Mutante 44-63A (vgl.dazu Tab.2), d. h. alle 6 relevanten Aminosäuren sind hier durch Alanin ersetzt. Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse. Man erkennt, dass die Hemmung einerseits mit steigender Konzentration an mutiertem Propeptid, bei konstanter Propeptidkonzentration zusätzlich noch mit steigender Inkubationszeit zunimmt um nach 1 bis 2 min einen stationären Zustand zu erreichen. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde in diesem und folgenden

Experimenten im Fall von slow binding inhibition der Ki-Wert nur für Anfangsbedingungen bestimmt. Tabelle 4 zeigt die entsprechenden Daten.

Tabelle 4: Initiale Inhibitionskonstanten für die Hemmung von Cathepsin S durch Cathepsin S- Propeptidmutanten

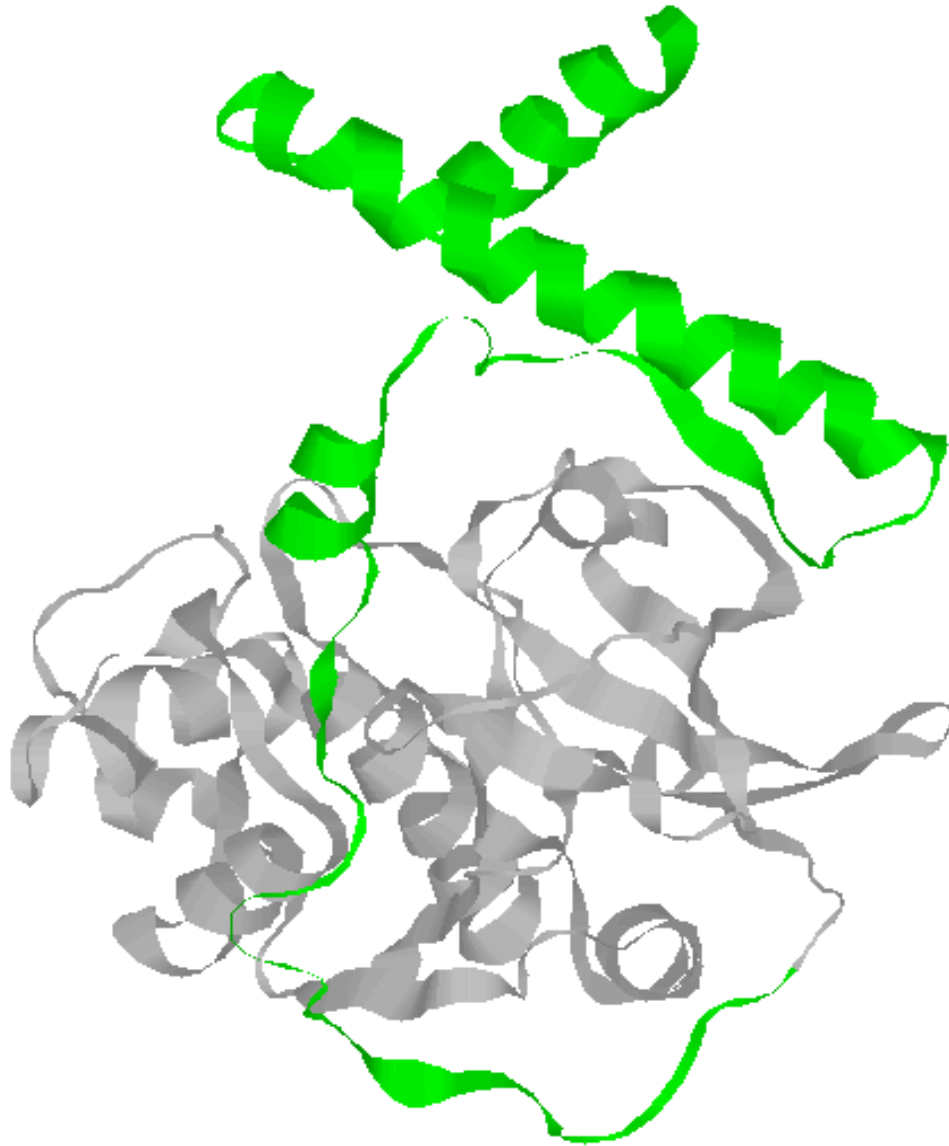
Inhibitor	Ki- value (nM)	S.E. (nM)
WT- propeptide	0,49	0,005
ppW28A	121,1	2,8
ppW31A	92,2	1,8
ppW28,W31A	1441	60
ppE44A	0,32	0,026
ppR48A	1,67	0,07
ppW52A	97,5	5,4
ppN55A	2,93	0,13
ppV59A	1,33	0,02
ppN63A	1,65	0,03
ppD82A	0,42	0,03
ppE44-N63A	1410	300
ppE44R48A	0,84	0,05
ppW52-N63A	1986	200
ppE87A	0,14	0,01

Die eingezeichneten Kurven in den Abbildungen 16-29 wurden, wie in der Methodik beschrieben, durch Optimierung der Parameter  $K_i$  und  $V_{\max}$  in Gleichung 2 durch nichtlineare Optimierung an die Messwerte angepasst. Der  $K_i$ -Wert liegt bei 1410 nM. Vergleicht man dieses Ergebnis mit dem publizierten  $K_i$ -Wert für die Inhibition von Cathepsin S durch den Wildtyp des Propeptids von 0,3 nM (Maubach et al. 1997), ergibt sich ein Affinitätsverlust von mehr als 3 Größenordnungen. Das ist ein eindeutiger Hinweis auf eine entscheidende Rolle der 6 konservierten ERF/WNV/IN-Aminosäuren bei der festen Bindung der Proregion an das Enzym. Um festzustellen, ob das Motiv insgesamt, Abschnitte davon oder evtl. nur eine der konservierten Aminosäuren von entscheidender Bedeutung sind, wurden vorerst 2 weitere Mutanten hergestellt, bei denen einmal im N-terminalen (E44R48A) und zum anderen



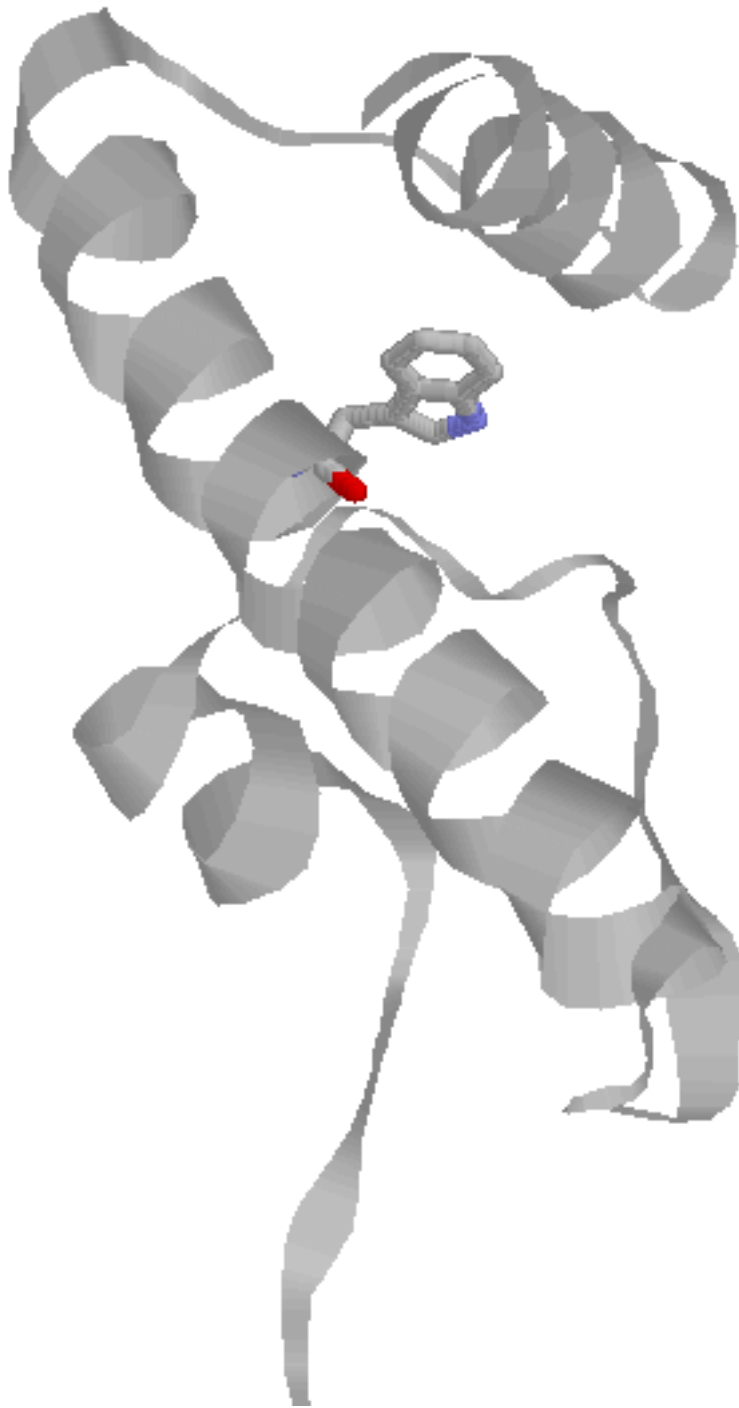
im C-terminalen Bereich (W52-N63A) mehrfach mutiert wurde. Für die Doppelmutante der ersten zwei Aminosäuren der ERF/WNV/IN-Sequenz, ergibt sich ein  $K_i$ -Wert von 0.84 nM. Das bedeutet, daß die Hemmkapazität nach Tausch dieser AS um mehr als drei Zehnerpotenzen größer ist, als nach Austausch aller hochkonservierten AS. Daraus kann man folgern, dass die Bedeutung des N-terminalen Anteils des ERF/WNV/IN-Motivs für die Inhibition nicht sehr gross sein kann. Nach Austausch der vier Aminosäuren des zweiten ERF/WNV/IN-Teilbereiches, ergeben sich hier ein Kurvenverlauf und ein  $K_i$ -Wert (1986 nM), die sehr gut mit denen der Austauschmutante aller konservierten Aminosäuren vergleichbar sind. Die Tatsache, dass nicht alle sechs Aminosäurereste für die untersuchte Funktion des ERF/WNV/IN-Motivs notwendig sind, spricht eher für eine Funktionsvielfalt als für eine gemeinsame Funktion, so dass in der nächsten Stufe der Untersuchung der Beitrag jeder einzelnen ERF/WNV/IN-Aminosäuren zur getesteten Funktion ermittelt wurde. Für diese Einfachmutanten ergaben sich mit einer Ausnahme  $K_i$ -Werte im unteren nanomolaren Bereich (0.32 - 2.93 nM; siehe Tabelle 3). Die Ausnahme bildet das Tryptophan an Position 52 (W52). Diese Mutante besitzt einen mit 97.5 nM um annähernd zwei Größenordnungen größeren  $K_i$ -Wert, ist also ein wesentlich schlechterer Inhibitor als die übrigen. Dies bedeutet, dass das Tryptophan an Position 52 eine besondere Bedeutung für diese Funktion des Propeptides hat. Es liegt die Vermutung nahe, dass es sich dabei um einen mittelbaren Effekt handelt, d.h. der Ersatz des Tryptophans durch Alanin verursacht primär eine Änderung der Sekundär- oder Tertiärstruktur. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde die strukturelle Bedeutung des W52 an einem Strukturmodell des Procathepsin S abgeschätzt, das mit Hilfe des Software-Programms Insight II auf der Grundlage der bekannten Procathepsin L-Struktur berechnet wurde. Dabei zeigte sich, daß W52, auf der  $\alpha 2$ -Helix gelegen, in der 3D-Struktur am Kreuzungspunkt der beiden Helices des Propeptides lokalisiert ist (siehe Abb.10). Die 3D-Struktur des Propeptides zeigt zwei weitere Tryptophane, W28 und W31, die auf der  $\alpha 1$ -Helix lokalisiert sind, die ebenfalls am Kreuzungspunkt der beiden Helices liegen (siehe Abb.12). Ein Homologievergleich mit anderen Propeptiden von Cysteinproteasen zeigt, dass auch diese beiden Tryptophane in der Cathepsin L-like Subfamilie hochkonserviert sind. Coulombe et al. (1996) gibt die Homologie dieser Aminosäuren im Vergleich von Proregionen von 39 Cathepsin-L ähnlichen Proteasen mit 95% an. Coulombe zeigte weiterhin für den Prototyp dieser Subfamilie, das Cathepsin L, einen am Kreuzungspunkt der  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ - Helices gelegenen hydrophoben Kern, bestehend aus den drei genannten Tryptophanresten. Auch im Cathepsin S könnten sich diese drei AS nach dem berechneten Struktur-

modell so aneinander stapeln, dass ihre aromatischen Seitenketten am Kreuzungspunkt der beiden Helices den hydrophoben Kern der Prodomäne ausbilden. Dieser Frage wurde im folgenden mit einem funktionellen methodischen Ansatz nachgegangen. Um auch diese Komponenten des postulierten hydrophoben Stapels zu substituieren und die Folgen zu beobachten, wurden die Austauschmutanten W28A, W31A und W28/31A hergestellt. Es zeigte sich für die Mutante W28A ein  $K_i$ -Wert von 121,1 nM, für die Mutante W31 resultierte ein  $K_i$ -Wert von 92,2 nM. Diese beiden Mutanten zeigen also ein Hemmverhalten, das dem der auffälligen W52A Mutante ähnlich ist. Sie haben einen  $K_i$ -Wert in der gleichen Größenordnung, der deutlich über dem der anderen konservierten ERF/WNV/IN-Aminosäuren liegt. Nach Austausch des gesamten Anteils der  $\alpha 1$ -Helix (W28/31) am hydrophoben Stapel hätte man zumindest einen ähnlichen Abfall der Hemmeigenschaft erwartet wie nach Austausch des W52 auf der  $\alpha 2$ - Helix. Das Ergebnis für diese Mutante ist jedoch ein Abfall der Hemmkapazität um eine weitere Größenordnung, mit einem  $K_i$ -Wert von 1441 nM. Diese Ergebnisse sprechen in ihrer Gesamtheit dafür, daß der Tryptophanstapel das entscheidende struktur-stabilisierende Element ist. Das gilt sicher auch für Propeptide anderer Mitglieder der Cathepsin L-ähnlichen Unterfamilie. Coulombe (et al. 1996) spricht in seiner Beschreibung der Proregion des Cathepsin L von 'verschränkten' Tryptophanen am Kreuzungspunkt der Helices. Das suggeriert durchaus eine die Struktur stabilisierende Funktion, die aber von den Autoren nicht weiter diskutiert wird. Im Gegenteil, sie weisen auf die große Bedeutung der Salzbrücken hinsichtlich des Strukturerhaltes hin. Es war naheliegend, mit dem hier gewählten methodischen Ansatz auch die Bedeutung der einzelnen Salzbrücken für den Funktionserhalt des Cathepsin S-Propeptides zu untersuchen. Dazu wurden die Mutanten E87A und D82A hergestellt, die an der Ausbildung von Salzbrücken beteiligt sind. Für die Mutante E87A ergab sich hierbei ein  $K_i$ -Wert von 0,14 nM, für die Mutante D82 ein  $K_i$ -Wert von 0,42 nM. Im Vergleich zu den dramatischen Abfällen der Hemmwirkung nach Mutationen im Bereich des hydrophoben Kerns, muss gefolgert werden, dass die Bedeutung der Salzbrücken für die Stabilität nicht so gross sein kann, wie bislang in der Literatur angenommen. Bei dem hydrophoben Kern am Kreuzungspunkt der Helices handelt es sich demgegenüber um ein bislang nicht näher untersuchtes, aber nach den vorliegenden Befunden für die Stabilität und Funktion der Proregionen entscheidendes Strukturmotiv.



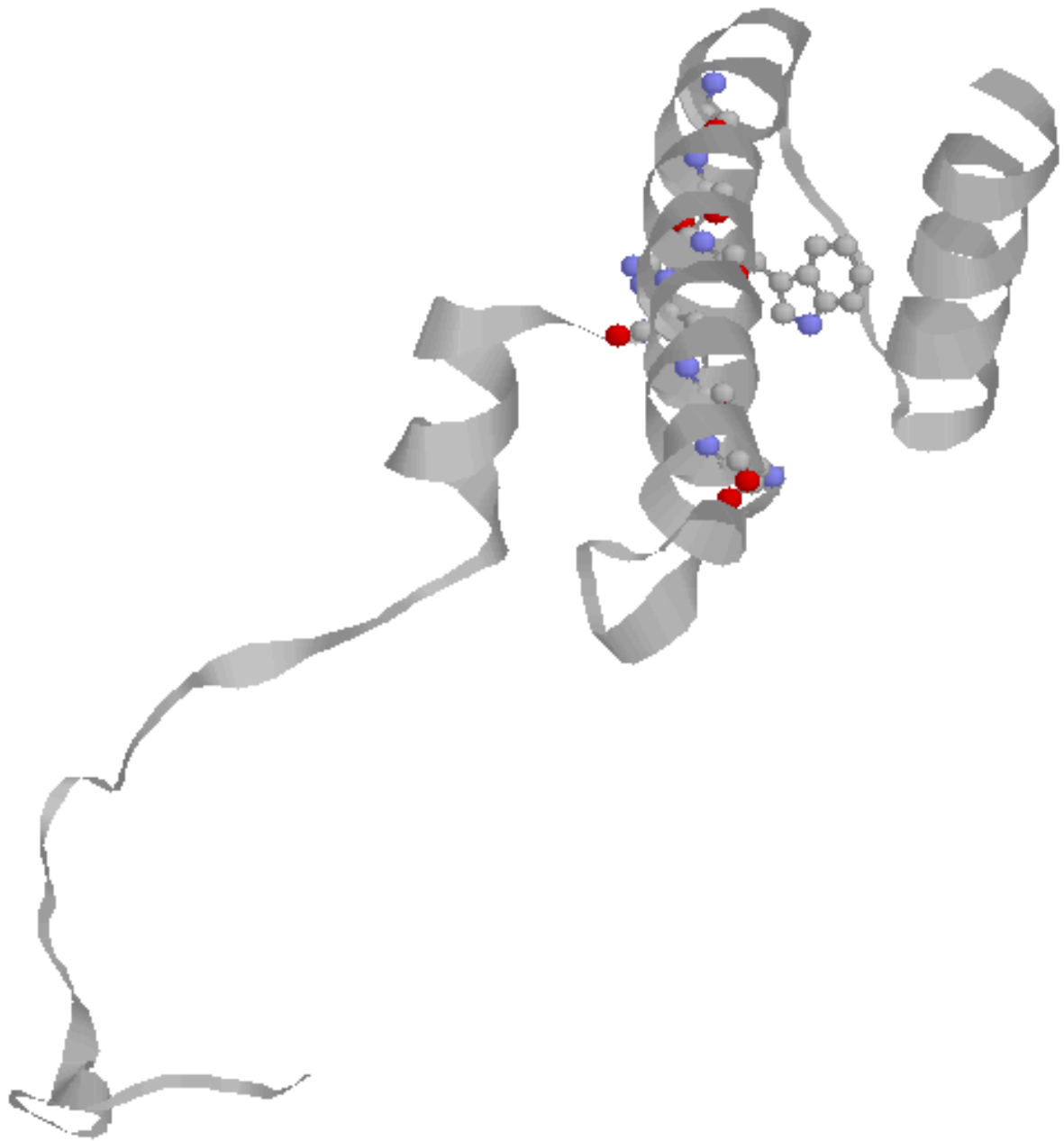
**Abb.10 Räumliche Struktur des Procathepsin S.**

In der Proform befindet sich, an den N-Terminus des Enzyms kovalent gebunden, die 100 Aminosäuren lange Proregion (farblich hervorgehoben). Man erkennt 3 Helices, horizontal die  $\alpha 2$ -Helix, darüber die  $\alpha 1$ -Helix, unterhalb die  $\alpha 3$ -Helix. Das Molekül wurde mit dem Programm Insight II errechnet.



**Abb.11 Lage des W52 am Kreuzungspunkt der beiden Helices**

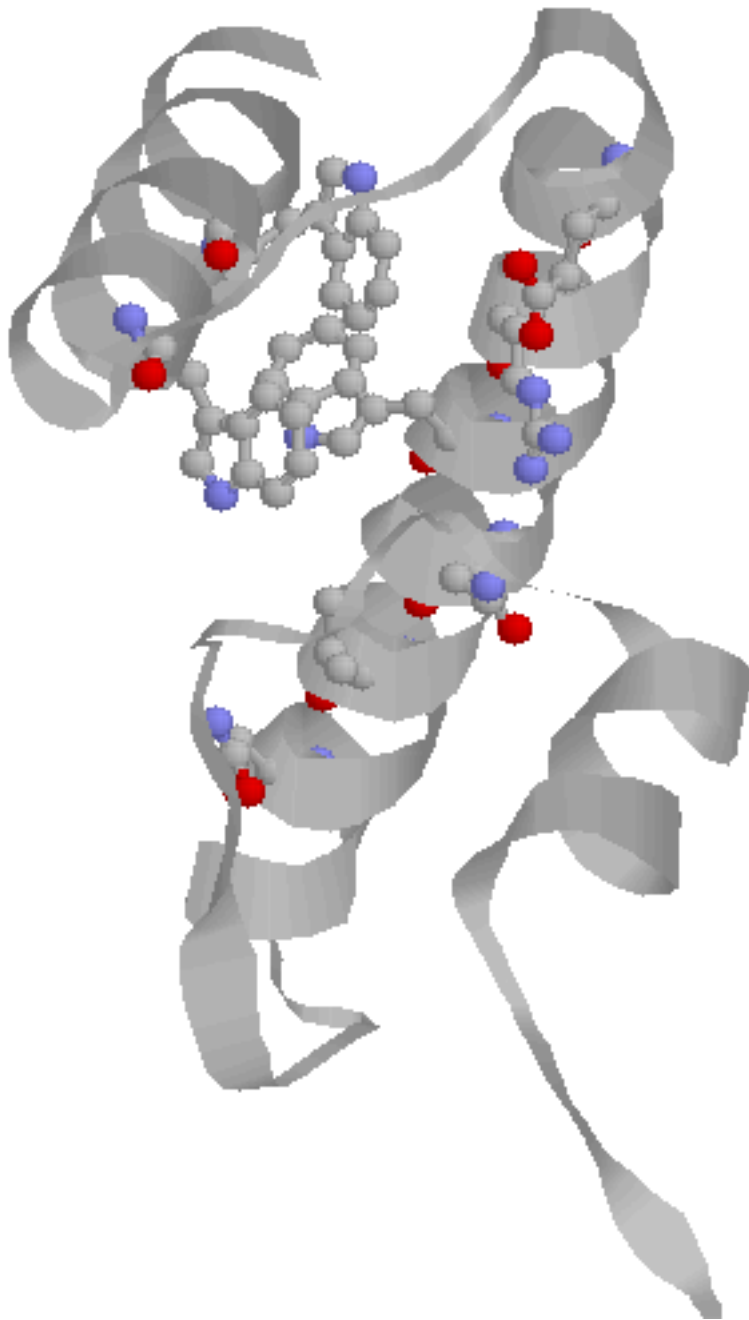
Bei der vollständig dargestellten Aminosäure sind N-Atome blau und O-Atome rot markiert. Die Moleküldarstellung wurde mit dem Programm Insight II errechnet.



**Abb.12 Orientierung der Reste der ERF/WNV/IN-Aminosäuren beim Blick durch die Helix**

Die Farbmarkierung entspricht der in Abb. 11.

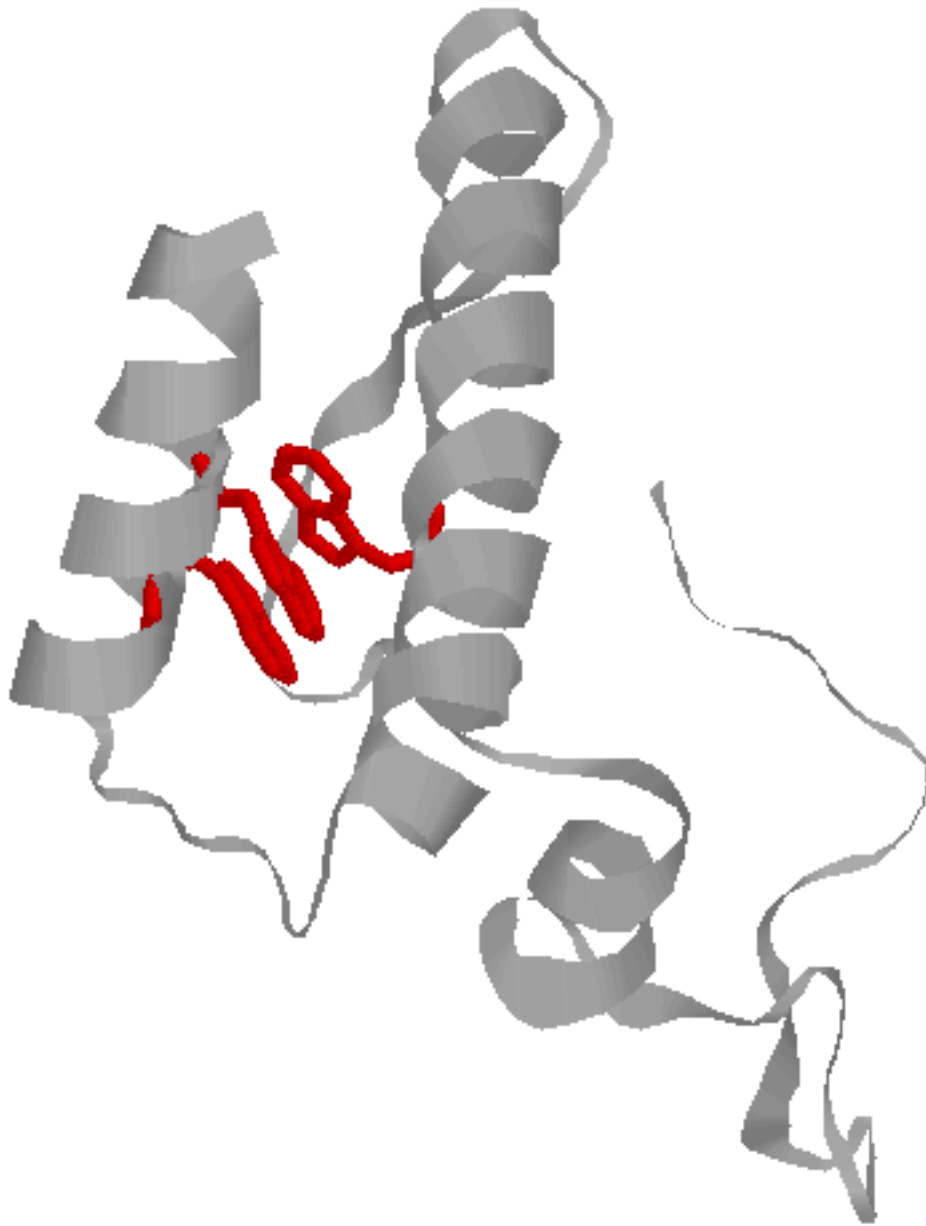
Die Moleküldarstellung wurde mit dem Programm Insight II errechnet.



**Abb.13 Nachbarschaft der drei konservierten Tryptophane am Kreuzungspunkt der beiden Helices**

Die Farbmarkierung entspricht der in Abb. 11.

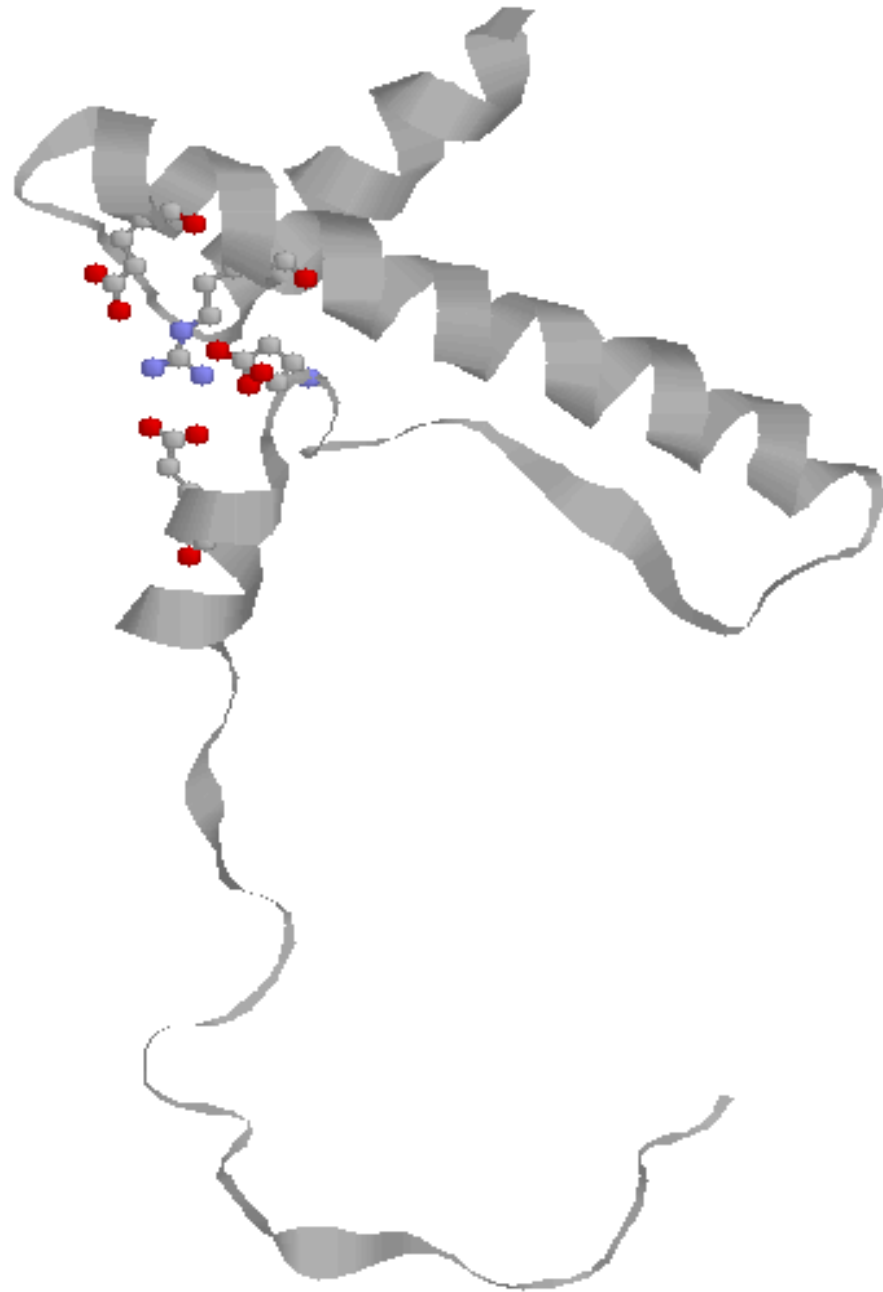
Die Moleküldarstellung wurde mit dem Programm Insight II errechnet.



**Abb.14 Die drei hydrophoben Reste der drei Tryptophane liegen nicht ineinander verschoben vor.**

Farblich hervorgehoben sind hier die drei aromatischen Tryptophanreste zu erkennen.

Die Moleküldarstellung wurde mit dem Programm Insight II errechnet

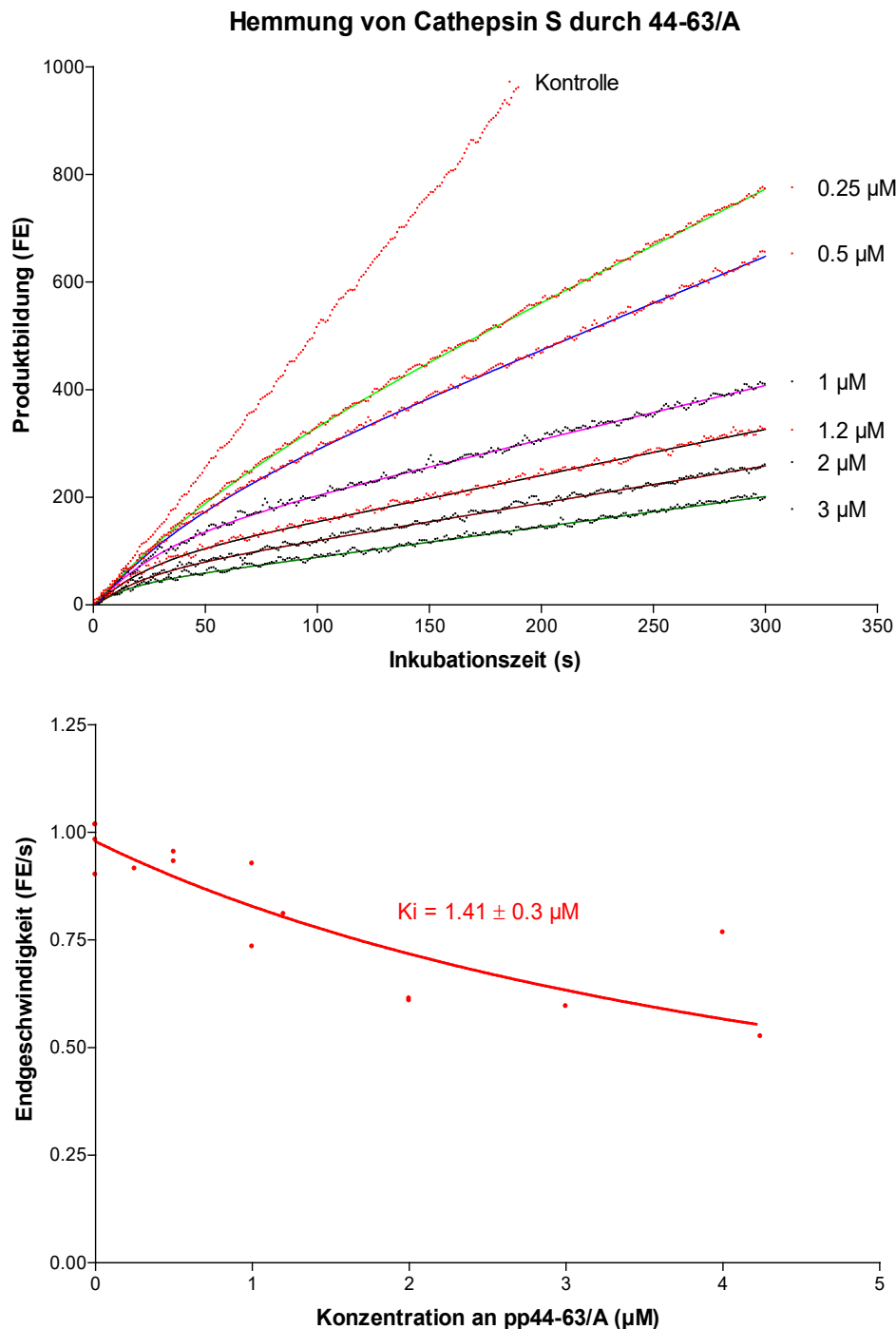


**Abb.15 Salzbrücken innerhalb des Propeptides Cathepsin S**

Die Farbmarkierung entspricht der in Abb. 11.

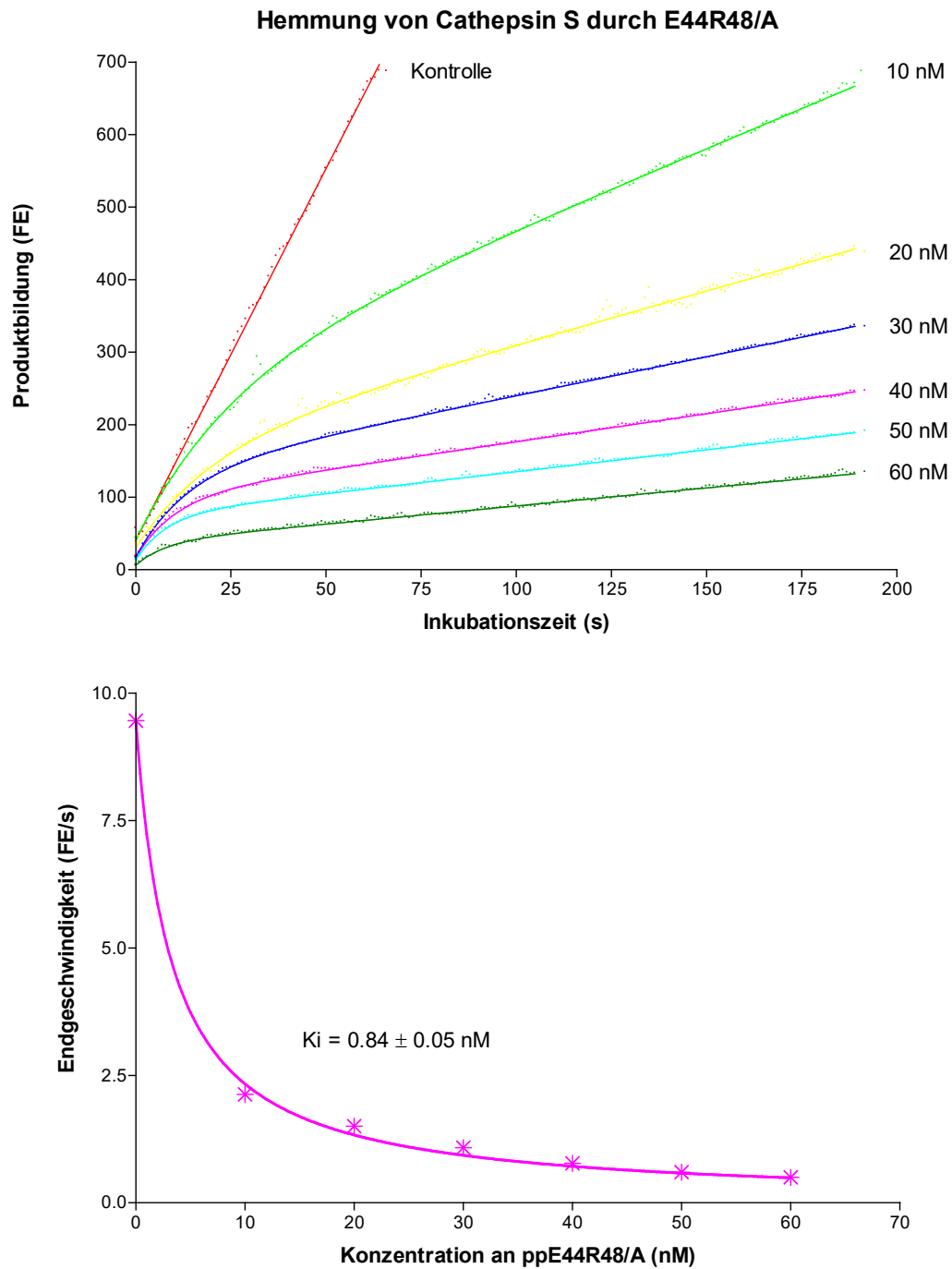
Die Moleküldarstellung wurde mit dem Programm Insight II errechnet.





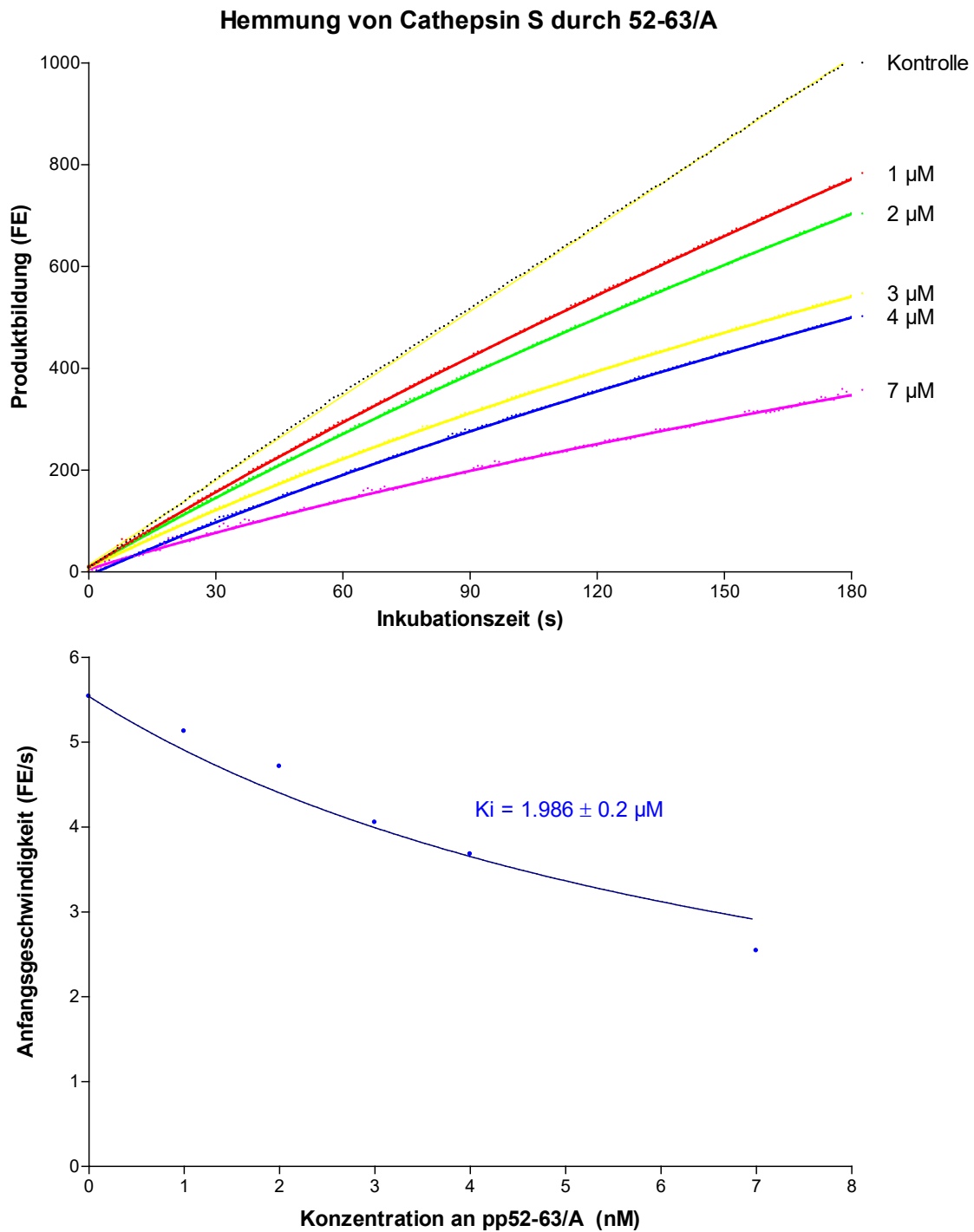
**Abb.16: Inhibierung von Cathepsin S durch das mutierte Propeptid 44-63/A.**

Die obere Teilabbildung zeigt den Zeitverlauf der Produktbildung durch Cathepsin S bei steigenden Propeptidkonzentrationen. Die Reaktionen fanden in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH= 6,5, 50mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 0,01% Triton X-100 statt. Die Enzymkonzentration lag bei etwa 0,25nM, die Substratkonzentration (Z-Val-Val-Arg-NHMec) bei 40μM. Es wurde bei 37°C in einer gerührten 2 ml Küvette bei 360 / 460 nm fluorometrisch gemessen. In der unteren Teilabbildung sind die Anfangsgeschwindigkeiten als Funktion der Inhibitorkonzentration dargestellt. Die eingezeichnete Kurve wurde durch Optimierung der Parameter in Gleichung 2 mit dem Programm „Prism“ erhalten, der  $K_i$ -Wert  $\pm$  SD ist angegeben.

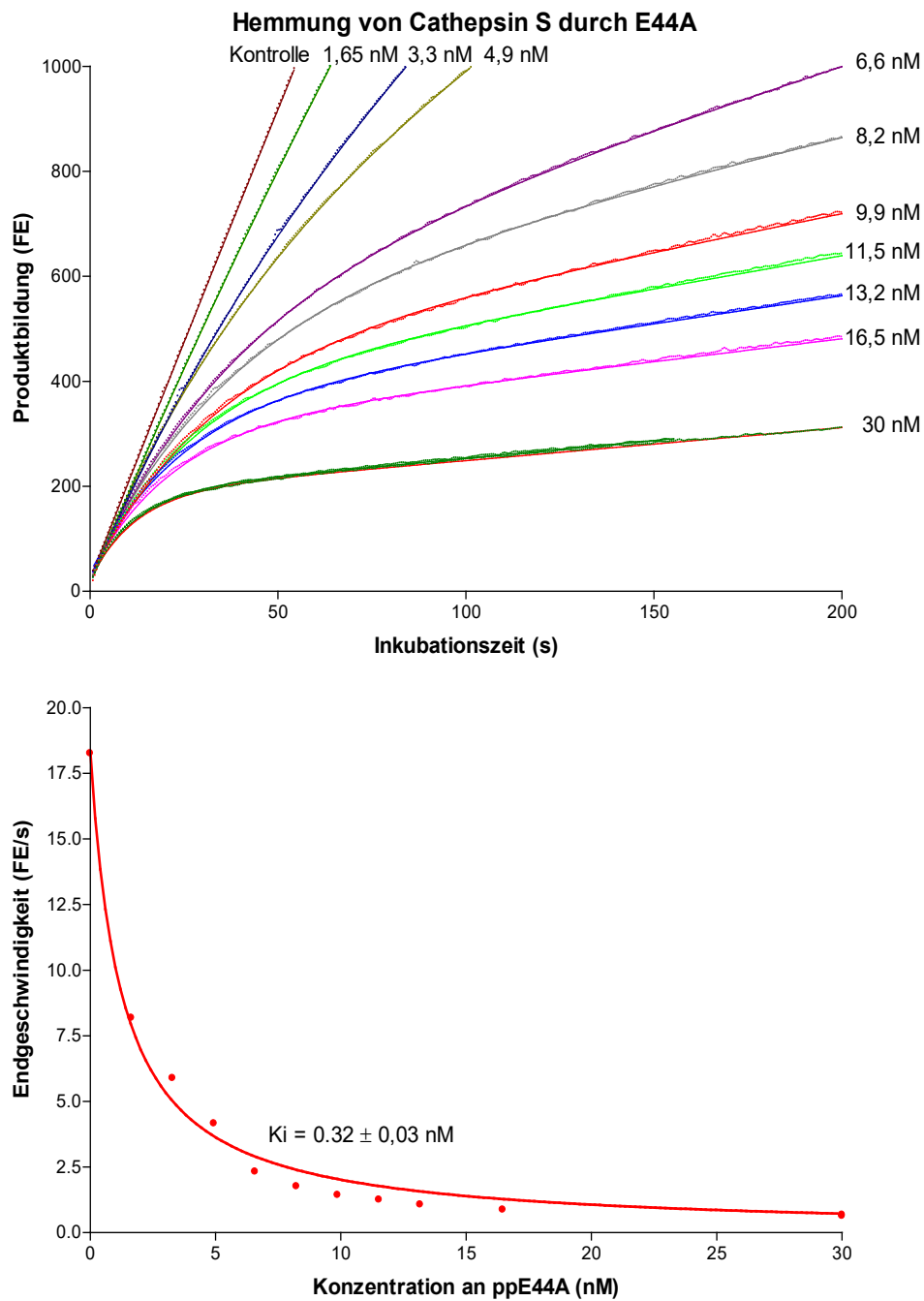


**Abb.17: Inhibierung von Cathepsin S durch das mutierte Propeptid E44R48/A.**

Die Versuchsbedingungen sind im wesentlichen die gleichen wie in Abb. 16 beschrieben

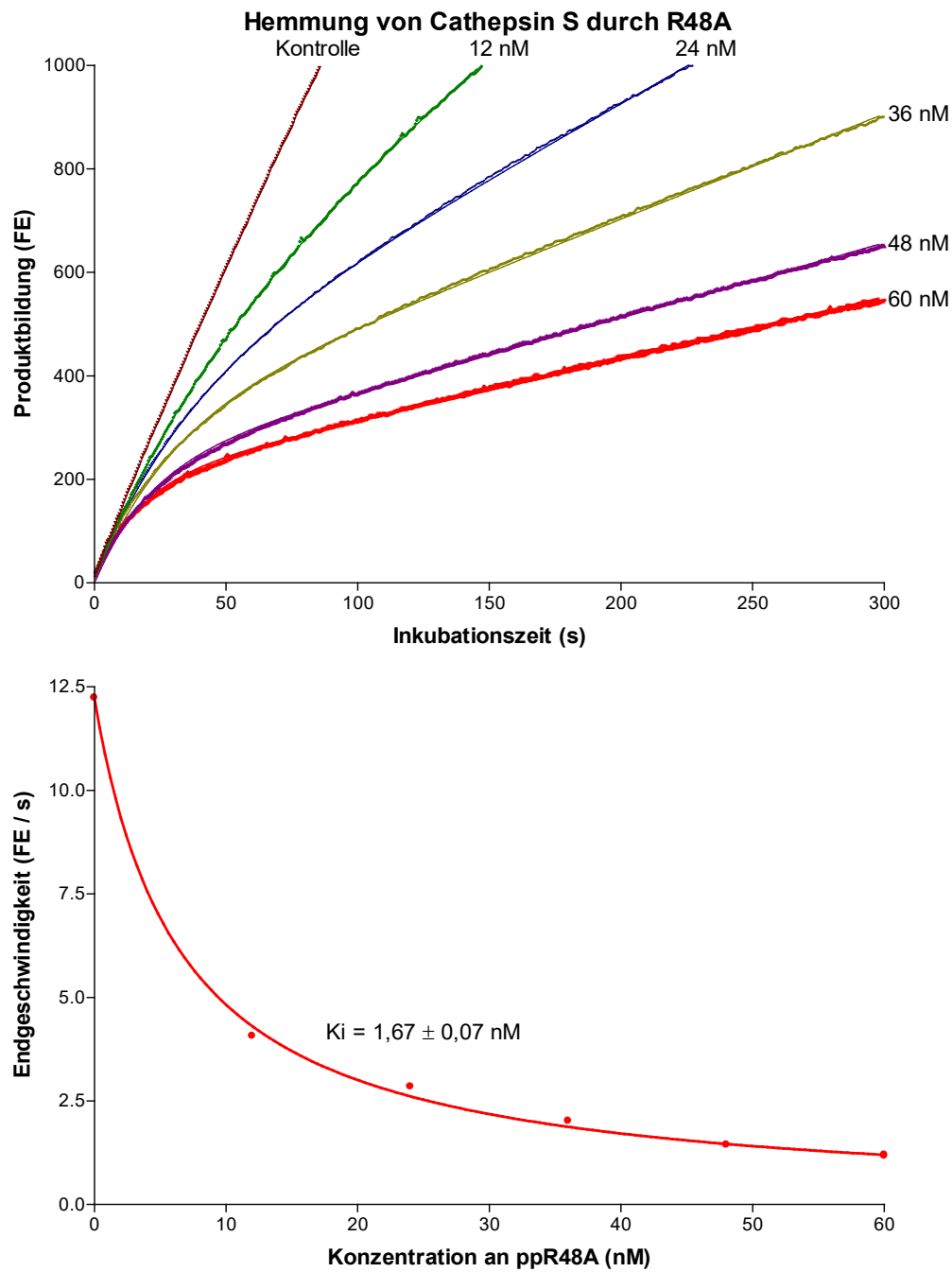


**Abb.18: Inhibierung von Cathepsin S durch das mutierte Propeptid 52-63/A.**  
 Die Versuchsbedingungen sind im wesentlichen die gleichen wie in Abb. 16 beschrieben



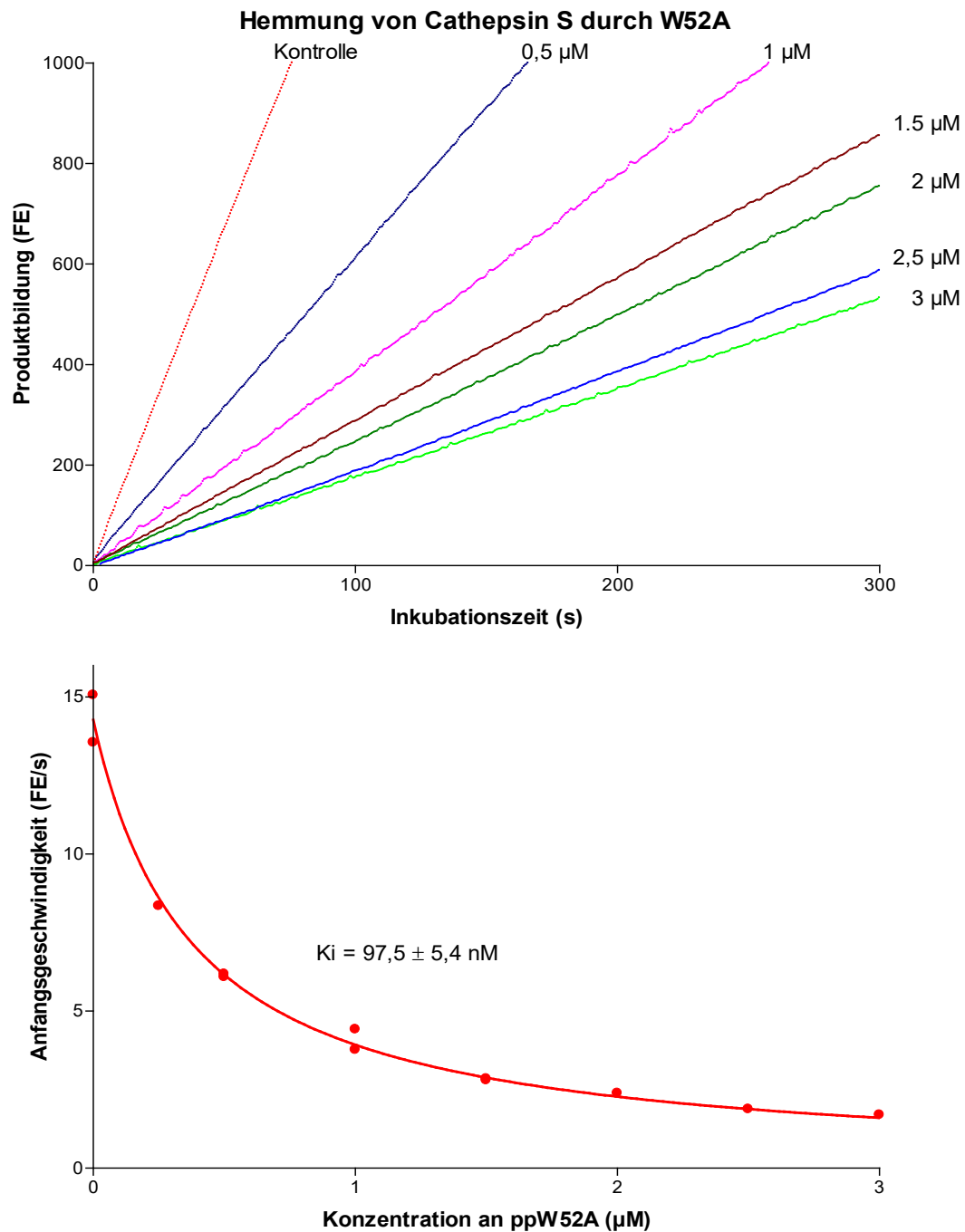
**Abb.19: Inhibierung von Cathepsin S durch das mutierte Propeptid E44A.**

Die Versuchsbedingungen sind im wesentlichen die gleichen wie in Abb. 16 beschrieben



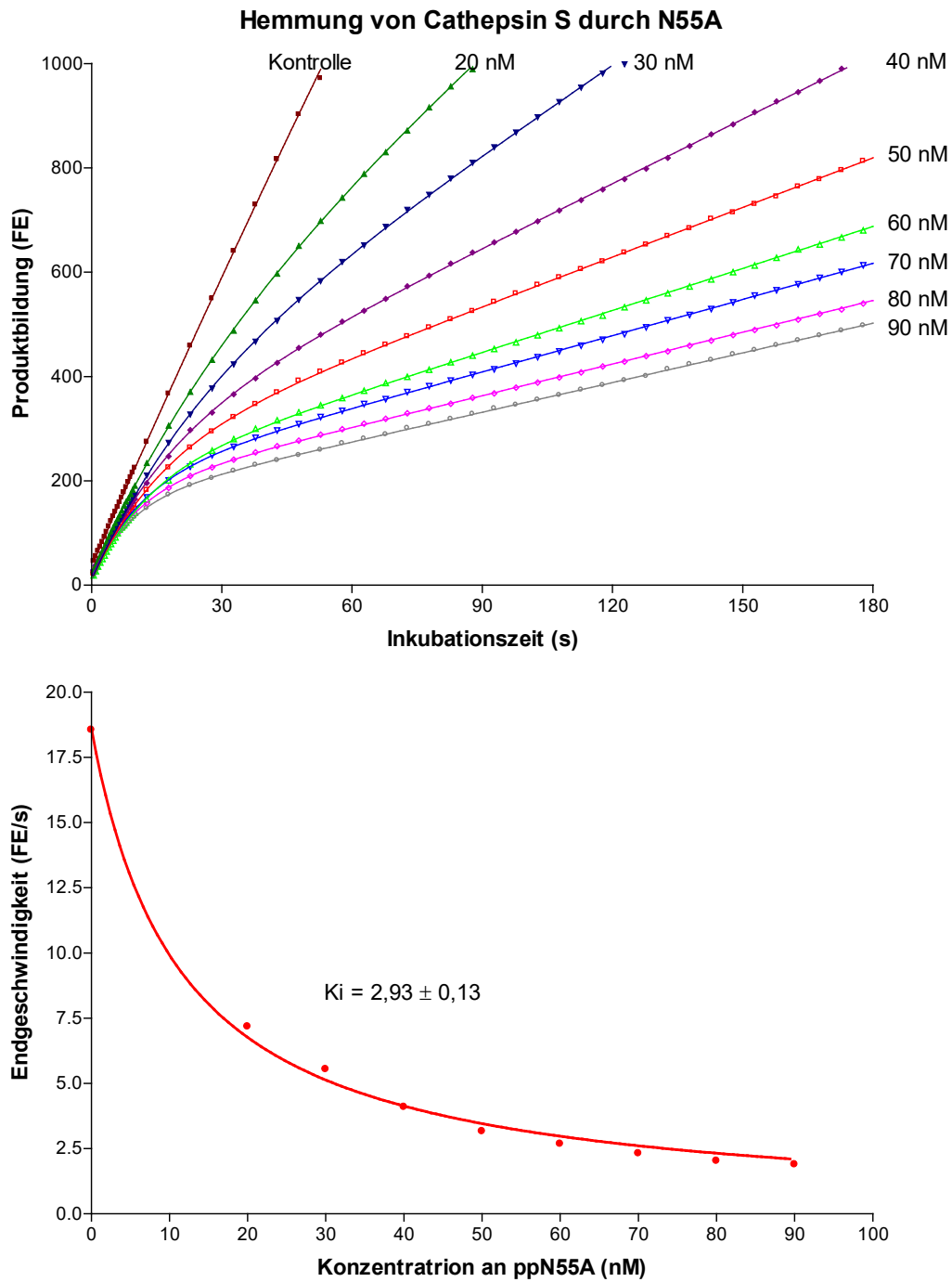
**Abb.20: Inhibierung von Cathepsin S durch das mutierte Propeptid R48A.**

Die Versuchsbedingungen sind im wesentlichen die gleichen wie in Abb. 16 beschrieben



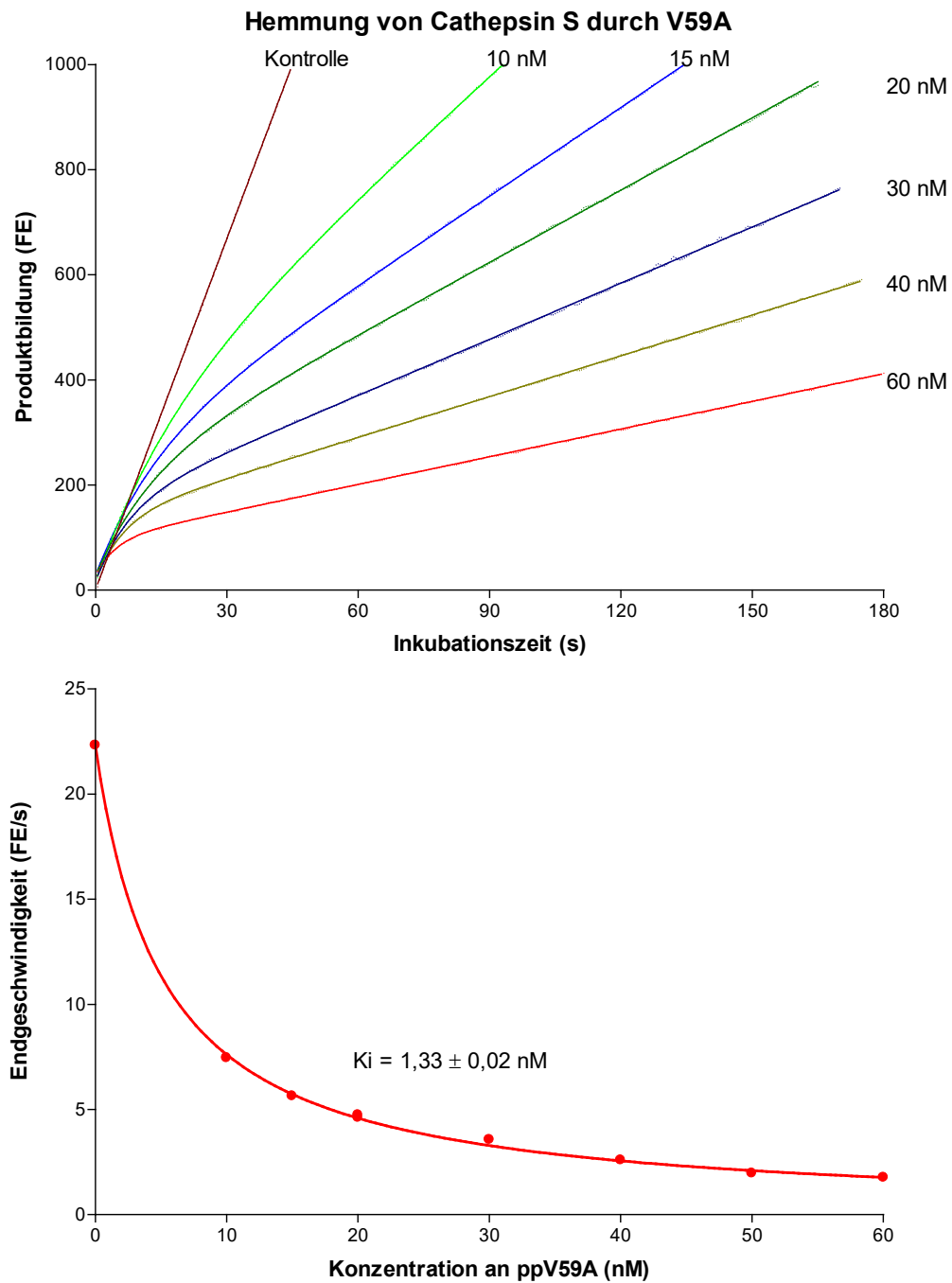
**Abb.21: Inhibierung von Cathepsin S durch das mutierte Propeptid W52A.**

Die Versuchsbedingungen sind im wesentlichen die gleichen wie in Abb. 16 beschrieben



**Abb.22: Inhibierung von Cathepsin S durch das mutierte Propeptid N55A.**

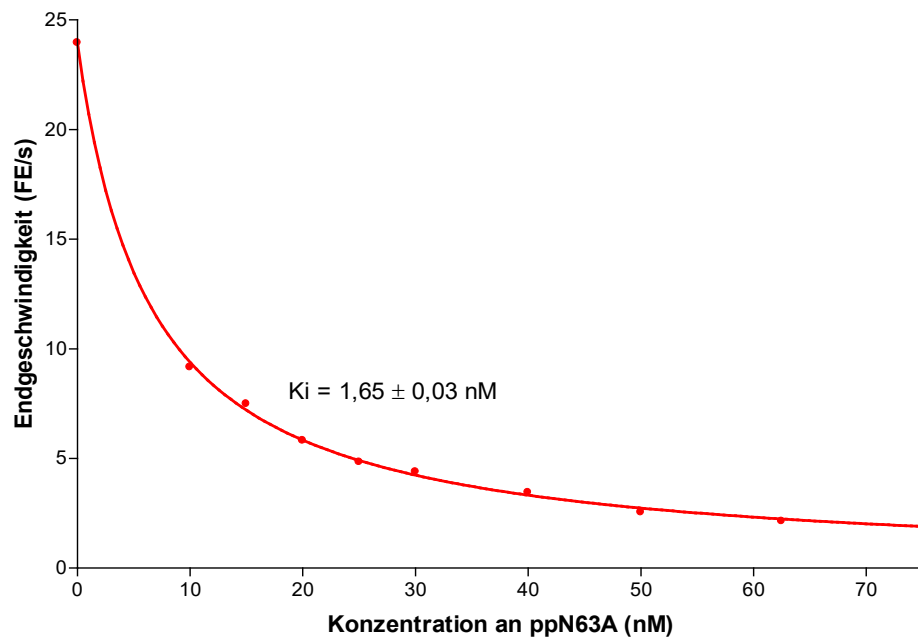
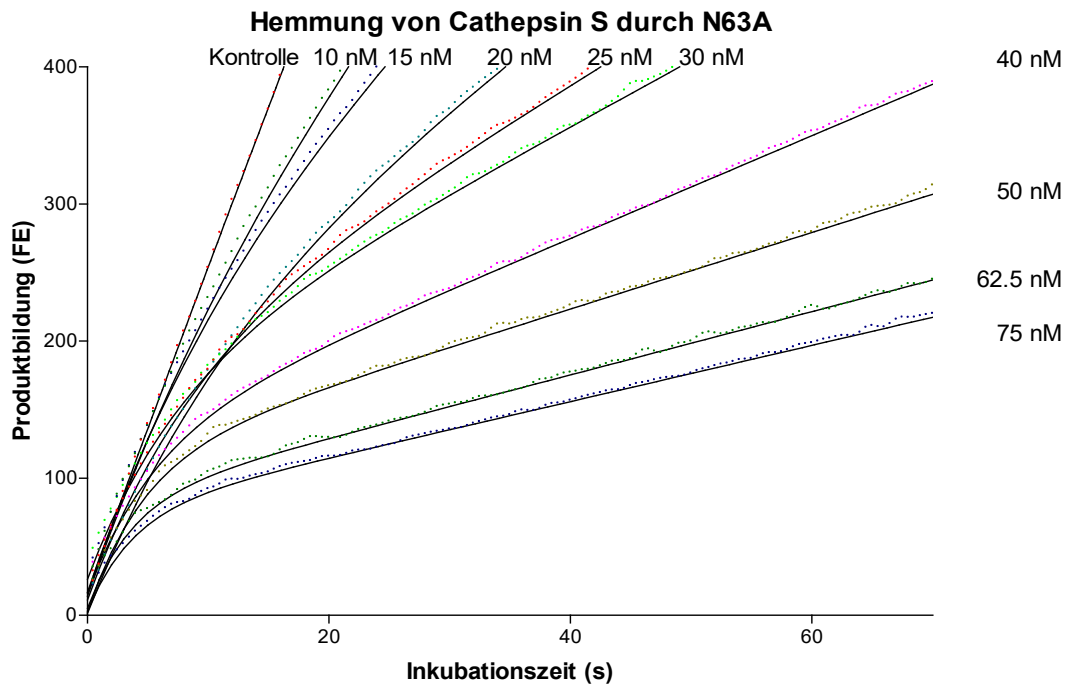
Die Versuchsbedingungen sind im wesentlichen die gleichen wie in Abb. 16 beschrieben



**Abb.23: Inhibierung von Cathepsin S durch das mutierte Propeptid V59A.**

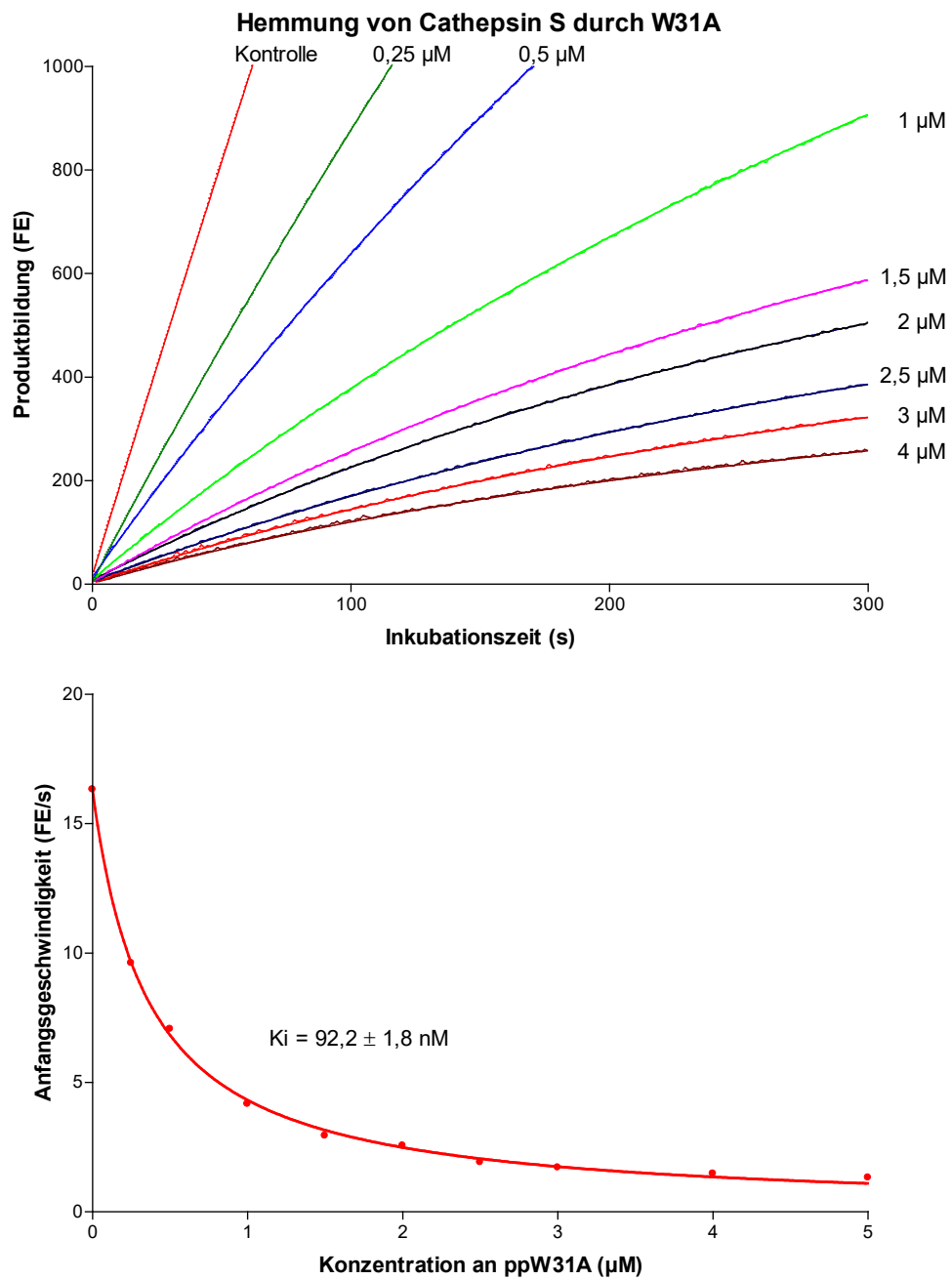
Die Versuchsbedingungen sind im wesentlichen die gleichen wie in Abb. 16 beschrieben





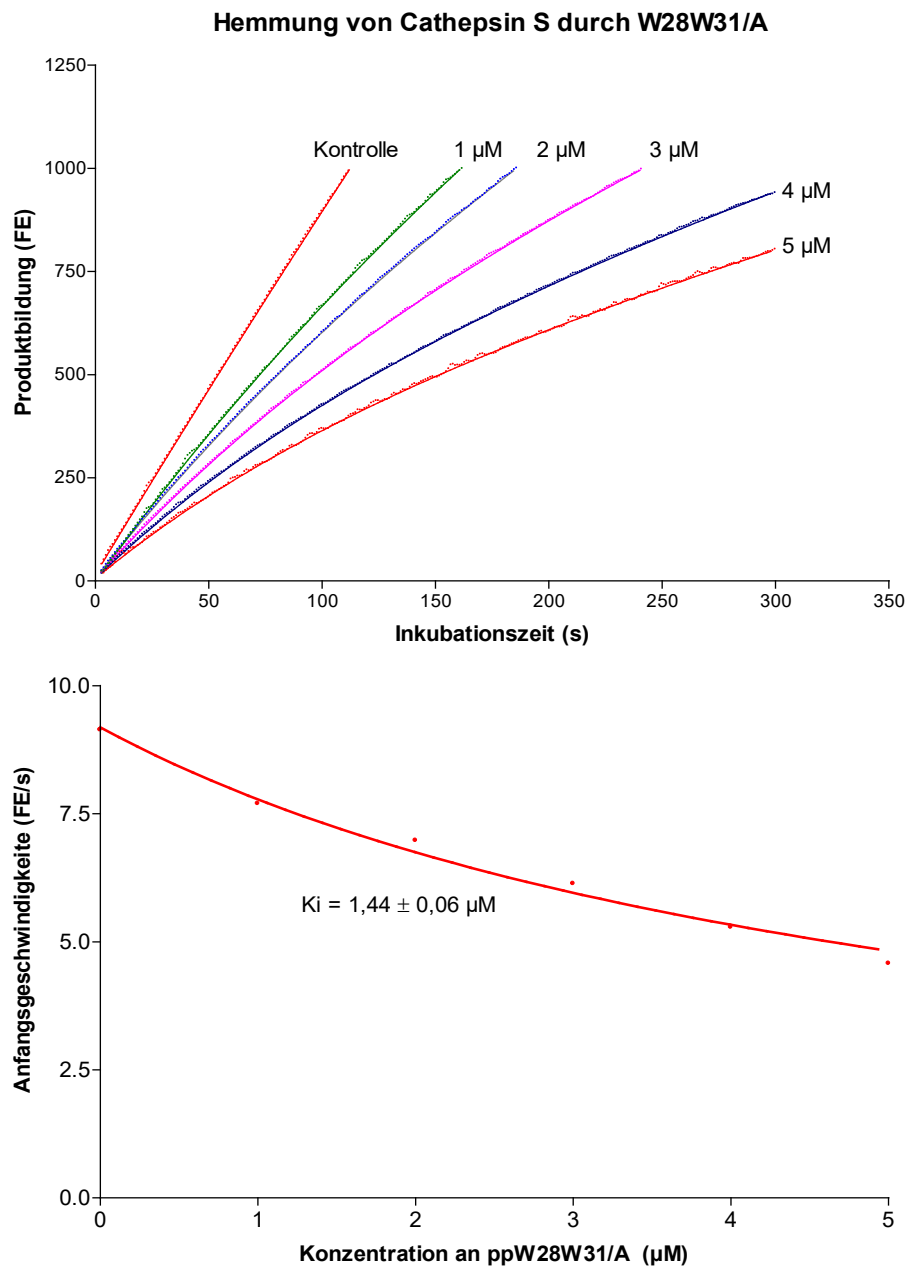
**Abb.24: Inhibierung von Cathepsin S durch das mutierte Propeptid N63A.**

Die Versuchsbedingungen sind im wesentlichen die gleichen wie in Abb. 16 beschrieben



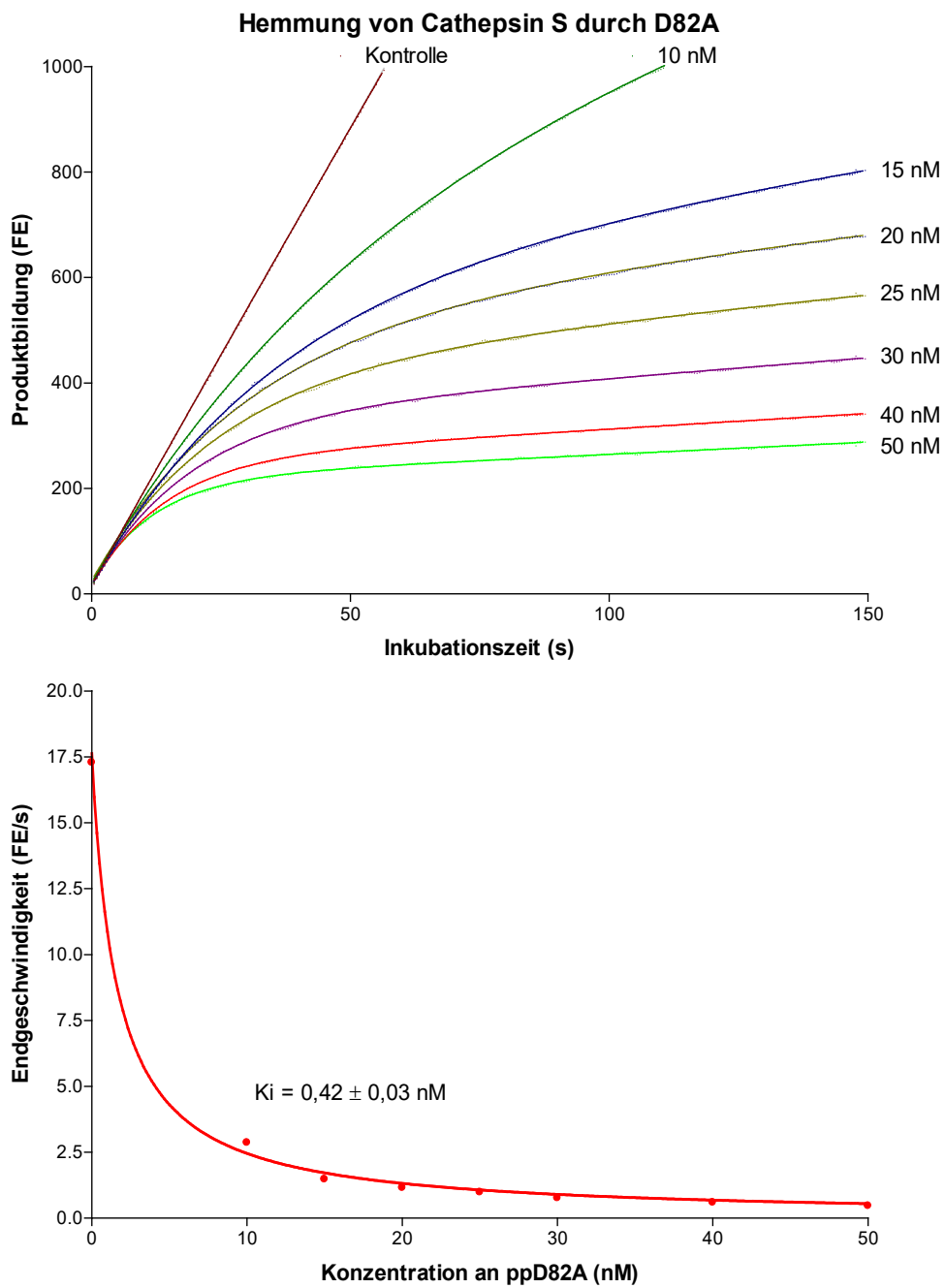
**Abb.25: Inhibierung von Cathepsin S durch das mutierte Propeptid W31A.**

Die Versuchsbedingungen sind im wesentlichen die gleichen wie in Abb. 16 beschrieben



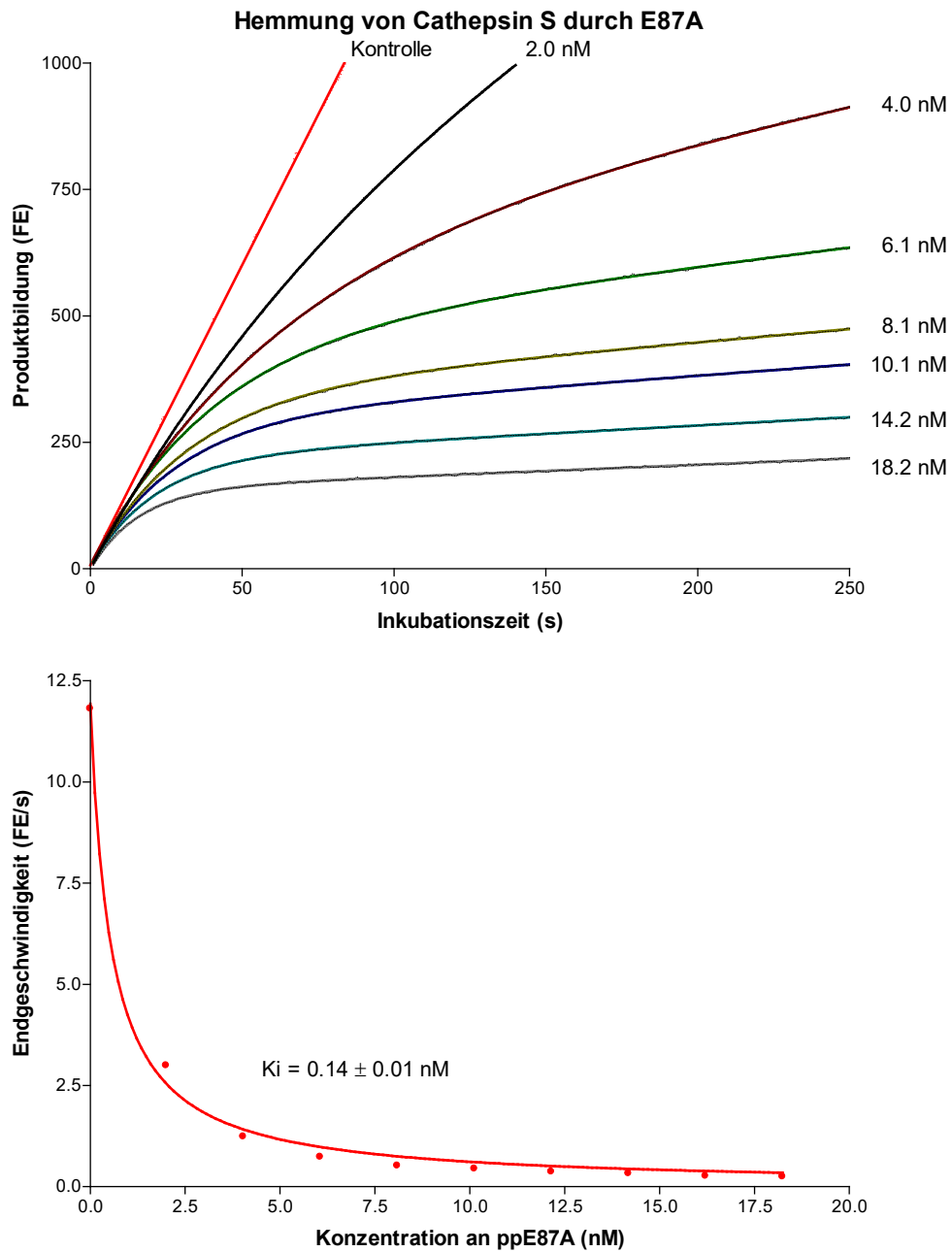
**Abb.26: Inhibierung von Cathepsin S durch das mutierte Propeptid W28W31/A.**

Die Versuchsbedingungen sind im wesentlichen die gleichen wie in Abb. 16 beschrieben



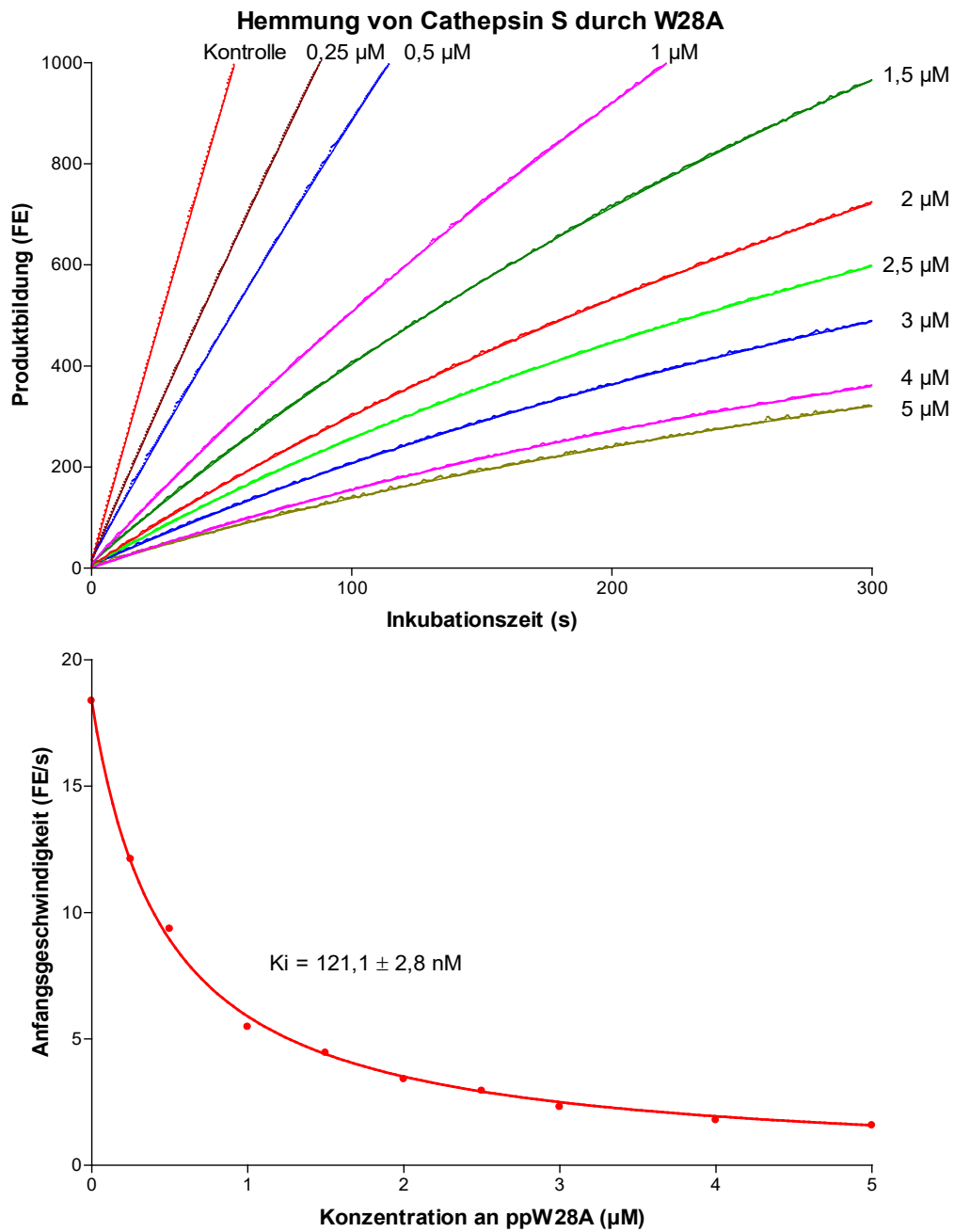
**Abb.27: Inhibierung von Cathepsin S durch das mutierte Propeptid D82A.**

Die Versuchsbedingungen sind im wesentlichen die gleichen wie in Abb. 16 beschrieben



**Abb.28: Inhibierung von Cathepsin S durch das mutierte Propeptid E87A.**

Die Versuchsbedingungen sind im wesentlichen die gleichen wie in Abb. 16 beschrieben



**Abb.29: Inhibierung von Cathepsin S durch das mutierte Propeptid W28A.**

Die Versuchsbedingungen sind im wesentlichen die gleichen wie in Abb. 16 beschrieben

## 4. Diskussion

Proteasen werden auf der Basis ihres aktiven Zentrums in vier Klassen eingeteilt: Metalloproteasen, Aspartat-, Serin- und Cysteinproteasen. Die meisten Proteasen werden als inaktive Vorläufermoleküle mit einer N-, oder C-terminalen Verlängerung, Proregion genannt, synthetisiert. Die Proregion fungiert als ein intrinsischer Inhibitor der proteolytischen Aktivität. Die kovalente Bindung zwischen Proregion und dem reifen Enzym ist jedoch nicht essentiell für den inhibitorischen Effekt. Dies wurde für eine Reihe von Proteasen aller Klassen gezeigt (Markaryan et al, 1996; Fusek et al., 1991; Baker et al., 1992; Taylor et al., 1995, Völkel et al. 1996). Die Klasse der Cysteinproteasen beinhaltet unter anderem die Papainfamilie, zu der Cathepsin S als Mitglied der Unterfamilie der Cathepsin L-ähnlichen Cysteinproteasen gehört. Auch in der Papainfamilie sind die Propeptide potente Inhibitoren der reifen Enzyme (Coulombe et al. 1996; Fox et al. 1992; Taylor et al., 1995). Diese Tatsache und der Umstand, dass die Hemmung auch eine deutliche Selektivität aufweist, macht die Propeptide auch für die praktische Medizin potentiell interessant. Fox et al. (1992) konnte diese Selektivität am Beispiel des Propeptides von Cathepsin B, welches Cathepsin B stark inhibierte, Papain jedoch nur schlecht, erstmals nachweisen. Für das Cathepsin L gelang dies Carmona et al, (1996), für Cathepsin S Maubach et al, (1996). Parallel zu diesen Untersuchungen begann die Suche nach inhibitorischen Strukturmotiven innerhalb der Moleküle. Insbesondere zum Propeptid von Cathepsin B gibt es eine Reihe von Untersuchungen (Illy et al. 1996; Yu et al. 1998; Chen et al. 1996; Chagas et al., 1996). Erhofft man sich doch, durch gezielte Beeinflussung der proteolytischen Aktivität unterschiedlicher Proteasen, in unterschiedlichste pathologische Abläufe, wie z.B. die Metastasierung von Tumoren (Yagel et al, 1989), Knochenresorption (Inui et al, 1997), Arthrose (Baici et al. 1991) oder rheumatoide Arthritis (Trabandt et al, 1991) eingreifen zu können. Ein Problem stellt in diesem Zusammenhang die Stabilität von Peptiden dar, unterliegen diese doch dem normalen proteolytischen Abbau. Das bedeutet, dass eine perorale Verabreichung solcher Therapeutika a priori nicht möglich ist. Kleine Peptidmoleküle verhalten sich im zellulären Metabolismus relativ stabil, doch sind die Propeptide grosse Moleküle, würden also schnell abgebaut, und damit unwirksam werden. Ein Ansatzpunkt zur Stabilisierung von grösseren Peptiden ist der Ersatz des an der Peptidbindung beteiligten Wasserstoffrestes durch eine Methylgruppe. So beschaffene Peptidbindungen werden nicht proteolytisch gespalten.

Karrer et al. (1993) verglichen die Primärstruktur zahlreicher Proenzyme der Papainfamilie. Sie fanden dabei die Subfamilien der Cathepsin B und Cathepsin L-ähnlichen

Endopeptidasen, die sich vor allem bezüglich der Proregionen unterscheiden. Am auffälligsten waren die Längenunterschiede. Während die ersteren etwa 100 Aminosäuren gross sind, umfassen die letzteren nur zirka 60 Aminosäuren. Die Propeptide der Cathepsin L-ähnlichen Proteasen zeigen in ihrer Primärstruktur eine erhebliche Homologie, insbesondere im Bereich der N-terminalen Verlängerung (Abb. 30).

CatL Human	TLTFDHSLEAQWTKWKAMHN--RLYG-MNEEGWRRAVWEKNMCKMIELHNQEYREGKHSF
CatL Mouse	TPKFDQTFSAEWHQWKSTHR--RLYG-TNEEWRRAIWEKNMRMIQLHNGEYSNGQHGF
CatL Rat	TPKFDQTFNAQWHQWKSTHR--RLYG-TNEEWRRAVWEKNMRMIQLHNGEYSNGKHGF
CatS Human	QLHKDPTLDHHWHLWKKTYG--KQYKEKNEEAVRRLIWEKNLKFVMLHNLEHSMGMHSY
CatS Rat	ERPTLDHHWDLWKKTRM--RRNTDQNEEDVRRLIWEKNLKFIMLHNLEHSMG
CatK Human	LYPEEILDTHWELWKKTHR--KQYNNKVDIISRRLIWEKNLKYISIHNLASLGV
CatK Rabbit	LHPEEILDTHWELWKKTYS--KQYNSKVDIISRRLIWEKNLKHISIHNLASLGV
CatH Human	ELSVNSLEKFHFKSWSMKHR--KTYSTE-EYHRLQTFSANWRKINAHN-NGN---HTF
CatH Rat	ELTVNAIEKFHFTSWMKQHQ--KTYSSR-EYSHRLQVFANNWRKIQAHN-QRN---HTF
CatV NPVAC	YDLLKAPNYFEEFVHRFN--KDYGSEVEKLRRFKIFQHNLNEIINKNQND-DS-
CatV NPVPM	YDPLKAPNYFEEFVHRFN--KNYSSEVEKLRRFKIFQHNLNEIINKNQND-DS-
CatV NPVCF	YDVLKAPNYFEEFLHKFN--KSYSSSESEKLRRFQIFRHNLEEIINKNHN--DST
PAPA CARPA	DLTSTERLIQLFESWMLKHN--KIYKNIDEKIYRFEIFKDNLKYIDETN-KKN---NSY

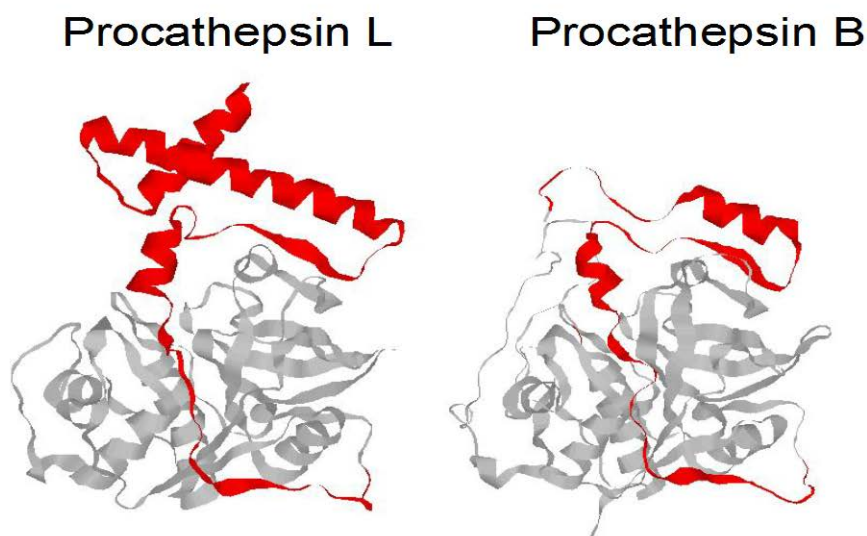
**Abb.30:** Alignment des N-terminalen Abschnittes von Propeptiden verschiedener Cathepsin L-ähnlicher Proteasen aus unterschiedlichen Spezies.

Diese N-terminalen Verlängerung unterscheidet sie von der Cathepsin B-ähnlichen Subfamilie (Karrer et al, 1993). Dort befindet sich auch die ERF/WNV/IN-Sequenz, die von diesen Autoren als besondere strukturelle und funktionelle Einheit betrachtet wurde. Die Tatsache, dass eine diesen Bereich einschliessende Verkürzung der Proregion zu einem erheblichen Funktionsverlust des entsprechenden Propeptids führte (Carmona et al. 1996), stützte diese Vermutung, und war letztendlich der Ausgangspunkt für die detaillierten vorliegenden Untersuchungen. Als ein entscheidender Vorteil erwies sich dabei die Veröffentlichung von Röntgenstruktur-daten zu Zymogenen der Papain-Familie. Sowohl Cathepsin B (Musil et al, 1996), Cathepsin L (Coulombe et al, 1996), wie auch weitere L-ähnliche Proteasen, z.B. Procaricain (Groves et al, 1996), Cathepsin K (LaLonde et al, 1999), wurden in den letzten Jahren in ihrer Proform kristallisiert und in ihrer Struktur aufgeklärt. Bezüglich der Struktur der Proregionen der L-ähnlichen Subfamilie ergibt sich folgendes Bild: Sie setzen sich aus einem N-terminalen, globulären Anteil und einem mehr gestreckten C-terminalen Anteil zusammen. Die etwa 60 Aminosäuren des globulären Anteils bilden eine kompakte Minidomäne aus zwei gekreuzten  $\alpha$ -Helices und einer  $\beta$ -Faltblattstruktur, die antiparallel zur  $\alpha$ 2-Helix läuft. Die erste und zweite Helix stehen in einem Winkel von etwa 60° zueinander, der Kreuzungspunkt im Zentrum der Domäne wird vermutlich durch hydrophobe Kräfte stabilisiert. An die  $\alpha$ 2-Helix des globulären Teils schließt sich über eine Schleife die bereits erwähnte kurze  $\beta$ -Faltblattstruktur an. Über diese 'helix-loop-sheet'-



Supersekundärstruktur werden Kontakte mit einer bestimmten Region der Enzymoberfläche, der sogenannten Propeptid-bindenden Schleife ('PBL' = propeptid-binding-loop) hergestellt. C-terminal folgen eine kurze dritte  $\alpha$ -Helix und ein Polypeptidkettenabschnitt, ohne spezifische Sekundärstruktur. Diese Polypeptidkette ist der eigentlich inhibierende Abschnitt des Propeptides, da sie sich zwischen die beiden katalytischen Domänen des Enzyms legt und das aktive Zentrum blockiert. Vermutlich wird sie zu diesem Zweck nicht nur von der Propeptid-bindenden-Schleife, sondern auch von der  $\alpha$ 2-Helix am Enzym positioniert und verankert.

Die Propeptide der Cathepsin B-ähnlichen Proteasen zeigen nicht nur untereinander strukturelle Homologie, sondern auch mit dem eben beschriebenen C-terminalen Abschnitt der L-ähnlichen Unterfamilie, der sich an der Propeptid-bindenden-Schleife und im aktiven Zentrum verankert. Das besondere der Cathepsin L-ähnlichen Propeptide ist folglich die N-terminale Erweiterung: die verlängerte  $\alpha$ 2-Helix ist über eine weitere Schleife mit der zusätzlichen  $\alpha$ 1-Helix verbunden. Diese Strukturelemente existieren bei den Cathepsin B-ähnlichen Propeptiden, wie in der untenstehenden Abbildung ersichtlich wird, nicht.



**Abb.31:** Strukturmodelle der Proformen von Cathepsin L und Cathepsin B. Die Proregionen der Cathepsin L-ähnlichen Formen besitzen, im Gegensatz zu den Mitgliedern der Cathepsin B-ähnlichen Subfamilie, eine komplette  $\alpha$ 1-Helix und  $\alpha$ 2-Helix

Übertragen auf das Strukturmodell befindet sich das bereits beschriebene konservierte ERF/WNV/IN-Motiv im Bereich der  $\alpha$ 2-Helix. Aus den Untersuchungen von Carmona et

al.(1996) geht hervor, dass eine Verkürzung des Propeptides von Cathepsin L um die beiden N-terminalen Helices zu einem dramatischen Verlust der Hemmkapazität führt. Damit ist klar, dass auch der globuläre Anteil der Proregion, der nach den vorliegenden Strukturdaten keinen Kontakt zum reifen Enzym hat, für die Hauptfunktion, die Hemmung der proteolytischen Aktivität, essentiell ist. Welche Bedeutung den konservierten Aminosäuren in diesem Bereich, insbesondere dem auffälligen ERF/WNV/IN-Motiv zukommt, ist bisher noch nicht untersucht worden.

Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst durch gezielte Punktmutationen alle konservierten Aminosäuren des ERF/WNV/IN-Motives gegen Alanin ausgetauscht. Es wird gezeigt, dass hierdurch ein enormer Abfall der Inhibitionskapazität entsteht. Der Austausch der sechs Aminosäuren hat also einen vergleichbaren Effekt wie die vollständige Deletion der beiden Helices. Das spricht für eine zentrale Bedeutung des mutierten Motivs für die untersuchte Funktion. Um zu testen, ob die sechs Aminosäuren diese Funktion im Verbund, also als Motiv, erfüllen oder ob Teilbereiche, vielleicht sogar nur eine einzelne der sechs Aminosäuren den entscheidenden Beitrag leisten, wurden in der nächsten Versuchsreihe jeweils zwei N-terminale und vier C-terminale konservierte Aminosäuren des ERF/WNV/IN-Motives ausgetauscht. Es zeigt sich, dass die beiden N-terminal gelegenen Aminosäuren keinen so grossen Einfluss haben, da nach Substitution durch Alanin ein nur geringer Abfall der Inhibitionskapazität zu verzeichnen ist. Anders verhält es sich im C-terminalen Bereich. Hier ist nach Austausch von vier konservierten Aminosäuren eine deutliche Veränderung, fast so gross wie die nach Substitution des gesamten ERF/WNV/IN-Motivs, zu registrieren. Damit war klar, dass das ERF/WNV/IN-Motiv keine Funktionseinheit darstellt und nach der individuellen Bedeutung jeder einzelnen der konservierten Aminosäuren gesucht werden muss. Dazu wurden Propeptid-Mutanten erzeugt, bei denen jeweils eine der sechs genannten AS durch Alanin ersetzt ist. Während die Mutationen E44A, R48A, N55A, V59A und N63A die Hemmkonstante ( $K_i$ ) gegenüber Cathepsin S nur vergleichsweise gering beeinflussten, zeigte die Mutante W52A einen Anstieg um mehr als zwei Grössenordnungen. Nach Substitution nur einer Aminosäure nimmt also die Hemmkapazität um mehrere Grössenordnungen ab. Innerhalb des ERF/WNV/IN-Motives gibt es also, obwohl alle sechs Aminosäuren hochkonserviert sind, eine deutliche Abstufung hinsichtlich ihrer Bedeutung für die untersuchte Hauptfunktion der Proregion, der Hemmung der proteolytischen Aktivität. Durch Analyse eines mit der Software Insight II errechneten Strukturmodells vom Propeptid des Cathepsin S (S. Kreusch et al., Veröffentlichung in Vorbereitung), welches auf Basis des

hohen Verwandtschaftsgrades von Cathepsin L und Cathepsin S und deren Propeptiden, und der schon bekannten Struktur von Cathepsin L und dessen Propeptides entworfen worden ist, wurde ersichtlich, dass dieses Tryptophan an Position 52 zwei Besonderheiten aufweist. Zum einen liegt es an der Kreuzungsstelle der  $\alpha 1$ -Helix mit der  $\alpha 2$ -Helix (siehe Abb.11). Beim Blick entlang der Helixachse ist sie zum anderen die einzige der konservierten Aminosäuren, deren Rest, verglichen mit den Resten der anderen, eine andere Orientierung aufweist (siehe Abb.12). Darüberhinaus zeigt das Strukturmodell, dass W52 Wechselwirkungen mit zwei Tryptophanaminosäuren der  $\alpha 1$ - Helix, W28 und W31 , die ebenfalls im Kreuzungsbereich der beiden Helices liegen, eingeht (siehe Abb.13). Ein Homologievergleich mit anderen Propeptiden von Cysteinproteasen zeigt, dass W28 und W31 ebenfalls hochkonserviert sind (Coulombe et al., 1996). Im Bereich der helicalen Kreuzung liegen also, auf beide Helices verteilt, drei hoch-konservierte Aminosäuren vor, deren hydrophobe Reste wechselwirken, und so ein entscheidendes, strukturstabilisierendes Motiv ausbilden könnten. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden die Mutanten W28/A und W31/A hergestellt und charakterisiert. Es zeigt sich, dass die  $K_i$ -Werte dieser  $\alpha 1$ -Tryptophanmutanten dem der  $\alpha 2$ -Tryptophanmutante vergleichbar ist. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die drei Tryptophane der Proregion des Propeptides entscheidend für die Stabilität der Prodomäne von Cathepsin L-ähnlichen Cysteinproteasen sind. Wird nur einer der drei Bausteine dieses Motives im Charakter verändert, hat dies dramatische Folgen für Struktur und Funktion des Propeptides. Coulombe beschreibt die Orientierung der konservierten Tryptophane (p12; p15; p35) im hydrophoben Kern des Propeptides von Cathepsin L weiterhin als ineinandergreifend ('interdigitating'). Die Reste der auf zwei Helices verteilten hydrophoben AS sollen so zueinander und ineinander verschoben gelagert sein, dass ihre stabilisierende Wirkung verstärkt wird. Um dieses Modell zu überprüfen, haben wir die Mutante W28/31A hergestellt, und somit den  $\alpha 1$  -Anteil der interdigitierenden Tryptophane entfernt. Es zeigt sich ein Abfall der Inhibitions-kapazität dieses Propeptides, der nochmals um eine ganze Größenordnung über dem der einfachen Tryptophanmutanten liegt. Funktionell könnte somit ein solch postuliertes Modell anhand des erhaltenen  $K_i$ -Wertes bestätigt werden. An der errechneten Struktur des Propeptides Cathepsin S zeigt sich jedoch, dass die drei Tryptophanreste nicht ineinander verschoben vorliegen (siehe Abb.14).

Coulombe et al. (1996), wie auch Groves et al. (1998), gehen in ihren Arbeiten ferner ausführlich auf die Salzbrücken innerhalb des Propeptides ein und diskutieren deren mögliche Bedeutung hinsichtlich der Strukturstabilität. Sie meinen, dass die Salzbrücken im N-

terminalen Anteil des Propeptides eine wesentliche Funktion zum Erhalt der globulären Struktur erfüllen. Auch die an der Ausbildung der Salzbrücken beteiligten Aminosäuren sind in der L- ähnlichen Subfamilie hochkonserviert. Drei an solchen Bindungen beteiligte Aminosäuren (E44, R48, D82) wurden in der vorliegenden Arbeit mutiert, eine weitere Alanin- Mutante (E87A) war in Vorversuchen bereits analysiert worden (siehe Abb.15).

In allen vier Fällen wurde lediglich ein vergleichsweise geringer Abfall der Hemmkapazität verzeichnet. Diese Ergebnisse ermöglichen eine Quantifizierung des Beitrages der Salzbrücken zum Strukturerehalt des Propeptides: er liegt deutlich unter dem der Wechselwirkungen im hydrophoben Kern, wo das aus den drei konservierten Tryptophanen (28;31;52) gebildete Strukturmotiv vermutlich die entscheidende Rolle spielt.

## 5. Literaturverzeichnis

Baici,A. Arthritis from a biochemical aspect. Ther. Umsch. (1991) Jan. 48(1):13-7

Baker,D., Silen,J.L., Agard,D.A. (1992) Protease proregion required for folding is a potent inhibitor of the mature enzyme. Proteins 12(4): 339-344

Carmona,E., Dufour,E., Plouffe,C., Takebe,S., Mason,P., Mort,J.S. and Menard, R. (1997) Potency and selectivity of the cathepsin L propeptide as an inhibitor of cysteine proteases. Biochemistry, 35, 8149-8157.

Chagas,J.R., Ferrer-Di-Martino,M., Gauthier,F. and Lalmanach,G. (1996) Inhibition of cathepsin B by its propeptide: use of overlapping peptides to identify a critical segment. FEBS-Lett., 392, 233-236.

Chen,Y., Plouffe,C., Menard,R. and Storer,A.C. (1996) Delineating functionally important regions and residues in the cathepsin B propeptide for inhibitory activity. FEBS-Lett., 393, 24-26.

Coulombe,R., Grochulski,P., Sivaraman,J., Menard,R., Mort,J.S. and Cygler,M. (1996) Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment. *EMBO J.*, 15, 5492-5503.

Cygler,M. and Mort,J.S. (1997). Proregion structure of members of the papain superfamily. Mode of inhibition of enzymatic activity. *Biochimie* 79, 645-652.

Fox,T., de Miguel,E., Mort,J.S. and Storer,A.C. (1992). Potent slow-binding inhibition of cathepsin B by its propeptide. *Biochemistry*, 31, 12571-12576.

Fusek,M., Mares,M., Vagner,J., Voburka,Z., Baudys,M. (1991) Inhibition of aspartatic proteinases by propeptides of human procathepsin D and chicken pepsinogen. *FEBS Lett.* 287(1-2): 160-162

Gallagher,T., Gilliland,G., Wang,L., Bryan,P. (1995) The prosegment -subtilisin BPN' complex: crystal structure of a specific 'foldase'. *Structure* 3(9): 907-914

Grassel,S. and Hasilik,A. (1992) Human chthepsin D precursor is associated with a 60 kDa glycosylated polypeptide. *Biochem.Biophys.Res. Commun.* 182(1): 276-282

Groves,M.R., Taylor,M.A., Scott,M., Cummings,N.J., Pickersgill,R.W. and Jenkins,J.A. (1996) The prosequence of procaricain forms an alpha-helical domain that prevents access to the substrate-binding cleft. *Structure*, 4, 1193-1203.

Groves,M.R., Coulombe,R., Jenkins,J., Cygler,M. (1998) Structural basis for specificity of papain-like cysteine protease proregions towards their cognate enzymes. *Proteins*.1998 Sep 1; 32(4): 504-14

Illy,C., Quraishi,O., Wang,J., Purisima,E., Vernet,T. and Mort,J.S. (1997) Role of the occluding loop in cathepsin B activity. *J. Biol. Chem.*, 272, 1197-1202.

Inui,T., Ishibashi,O., Inaoka,T., Origane,Y., Kumegawa.M., Kokubo,T., Yamamura,T. (1997) Cathepsin K antisense oligodeoxynucleotide inhibits osteoclastic bone resorption. J. Biol. Chem. 272, 8109-8112

Karrer,K.L., Pfeifer,S.L. and DiTomas,M.E. (1993) Two distinct gene families within the family of cysteine protease genes. Proc.Natl. Acad. Sci. USA 90, 3063-3067.

Kolkorst,V. ,Sturzebecher-J. ,Wiederanders B. Inhibition of tumor cell invasion by protease inhibition: correlation with the proteases profile. J. Cancer Research Clinical Oncology, 1998; 124(11): 598-606

Kirschke,H., Barrett,A.J., Rawlings,N.D. (Eds.) (1998) Protein Profile. Lysosomal cysteine proteases 2nd edition, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.

Kreusch,S. et al., Publikation in Vorbereitung

LaLonde,J.M., Zhao,B., Janson,C.A., D'Alessio,K.J., McQueney,M.S., Orsini,M.J., Debouck,C.M. and Smith,W.W. (1999) The crystal structure of human procathepsin K. Biochemistry 38, 862-869.

Markaryan,A., Lee,J.D., Sirakowa,T.D., Kollatukudy, P.E., (1996) Specific inhibition of mature fungal serine proteinases and metalloproteinases by their propeptides. J. Bacteriol. 178(8): 2211-2215

Maubach,G., Schilling,K., Rommerskirch,W., Wenz,I., Schultz,J.E., Weber,E. and Wiederanders,B. (1997) The inhibition of cathepsin S by its propeptide. Specificity and mechanism of action. Eur. J. Biochem., 250, 745-750.

McIntyre,G.F., Godbold,G.D. and Erickson,A.H. (1994). The pH-dependent membrane association of procathepsin L is mediated by a 9-residue sequence within the propeptide. J. Biol. Chem. 269, 567-572.

Nakagawa,T., Roth,W., Wong,P., Nelson,A., Farr,A., Deussing,J., Villadangos,J.A., Ploegh,H., Peters,C., RudenskyA.Y. Cathepsin L: Critical role and CD<sup>4</sup> T cell selection in the Thymus. *Science*. Vol 280, 17.4.1998, 450-453

Navab,R., Mort,J.S., Brodt,P. Inhibition of carcinoma cell invasion and liver metastases formation by their cysteine protease inhibitor E-64. *Clin. Exp. Metastasis* (1997) Mar, 15(2): 121-9

Riese,R.J., Wolf,P.R., Brömme,D., Ntakin,L.R., Viladangos,J.A., Ploegh,H.L., Chapman,H.A. (1996) Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* 4(4): 357-366

Shi-CS; Leonardi-A; Kyriakis-J; Siebenlist-U; Kehrl-JH (1999), TNF-mediated activation of the stress-activated protein kinase pathway: TNF receptor-associated factor 2 recruits and activates germinal center kinase related.J-Immunol.; 163(6): 3279-85

Shinde,U. and Inouye,M. (eds., 1995) *Molecular Biology Intelligence Unit. Intramolecular chaperones and protein folding*. Springer- Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London.

Smith,S.M. and Gottesman,M.M. (1989). Activity and deletion analysis of recombinant human cathepsin L expressed in *E. coli*. *J. Biol. Chem.*, 264, 20487-20495.

Tao,K., Stearns,N.A., Dong,J., Wu,Q. and Sahagian,G.G. (1994) The proregion of cathepsin L is required for proper folding, stability and ER exit. *Arch. Biochem. Biophys.*, 311,19-27.

Taylor,M.A., Baker,K.C., Briggs,G.S., Connerton,I.F., Cummings,N.J., Pratt,K.A., Revell,D.F., Freedman,R.B. and Goodenough,P.W. (1995) Recombinant pro-regions from papain and papaya proteinase IV-are selective high affinity inhibitors of the mature papaya enzymes. *Protein Eng.*, 8, 59-62.

Trabandt,A., Gay,R.E., Fassbender,H.G., Gay,S. (1991) Cathepsin B in synovial cells at the site of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 34, 1444-1451

Turk,D. Podobnik,M., Kuhelj,R., Dlinar,M., Turk,V. (1996) Crystal structures of human procathepsin B at 3.2 and 3.3 Angstroms resolution reveal an interaction motif between a papain-like cystein protease and ist propeptide. FEBS Lett. 384, 211-214

Villadangos,J.A., Riese,R.J., Peters,C., Chapman,H.A., Ploegh,H.L. (1997) Degradation of mouse invariant chain: roles of cathepsin S and D and the influence of major hisocompatibility complex polymorphism. J.Exp. Med. 186(4): 549.560

Völkel,H., Kurz,U., Linder,J., Klumpp,S., Gnau,V., Jung,G. and Schultz,J.E. (1996). Cathepsin L is an intracellular and extracellular protease in *Paramecium tetraurelia*. Purification, cloning, sequencing, and specific inhibition by its expressed propeptide. Eur. J. Biochem., 238, 198-206.

Wiederanders,B., Brömme,D., Kirschke,H., von Figura,K., Schmidt,B. and Peters,C. (1992). Phylogenetic conservation of cysteine proteinases. Cloning and expression of a cDNA coding for human cathepsin S. J. Biol. Chem. 267, 13708-13713.

Yagel,S., Warner,A.H., Nellans,H.N., Lala,P.K., Waghorne,C., denhardt,D.T. (!989) Suppression by cathepsin L inhibitors of the invasion of amnion membranes by murine cancer cells. Cancer Research 49, 3553-3557

Yu,Y. et al., An NMR-based identification of peptide fragments mimicking the interactions of propeptide cathepsin B. FEBS Lett. (1998 jun.5.;429(1):9-16



## **Danksagung:**

Herrn Prof. Dr. Wiederanders möchte ich für die Vergabe des Themas und seine Hilfestellungen danken.

Ein ganz grosses und herzliches Dankeschön gebührt meinem direkten Betreuer Herrn Dr.Schilling, für wirklich intensive Unterstützung, Motivierung,sehr gute Koordination und Flexibilität auch bei spontanen `Überfällen`sowohl in jeder Phase der Arbeit, wie auch beim Schreiben und den vielen Nachhilfeeinheiten in Fragen der Informatik.

Weiterhin, an (Dr.) Stefan Kreusch, für die Anleitung im genetischen Teil, wie auch den kinetischen Experimenten.

Auch den Dtres. Maubach, Pissowotzki und Rommerskirch sowie Ablis, für ständige Hilfsbereitschaft, ein immer offenes Ohr, für `geliehene` Bakterienstämme und Polymerasen, Motivation und kritische Diskussionen, wenn wochenlang keine Mutation gelang, Erstellung von Graphiken, usw..

Dank auch an TA Simone, ohne deren Ordnung nichts lief und an alle anderen, die auf irgendeine Art, und sei es ein aufmunterndes Wort, zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dank auch an den Förderverein der medizinischen Fakultät und an die Jenapharm GmbH, für die finanzielle Unterstützung in Form des mir zuerkannten Stipendiums.

Last aber ganz sicher nicht least möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium und damit auch erst die vorliegende Arbeit erst ermöglicht haben.

**Ehrenwörtliche Erklärung:****Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,**

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. Wiederanders, Dr. Schilling, Dr. Kreusch, Dr. Maubach, Dr. Rommerskirch, Dr. Pissowotzki.

Die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena den 13.7.00  
Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers